

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/003888

International filing date: 13 April 2005 (13.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: 04008881.7
Filing date: 14 April 2004 (14.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 29 April 2005 (29.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

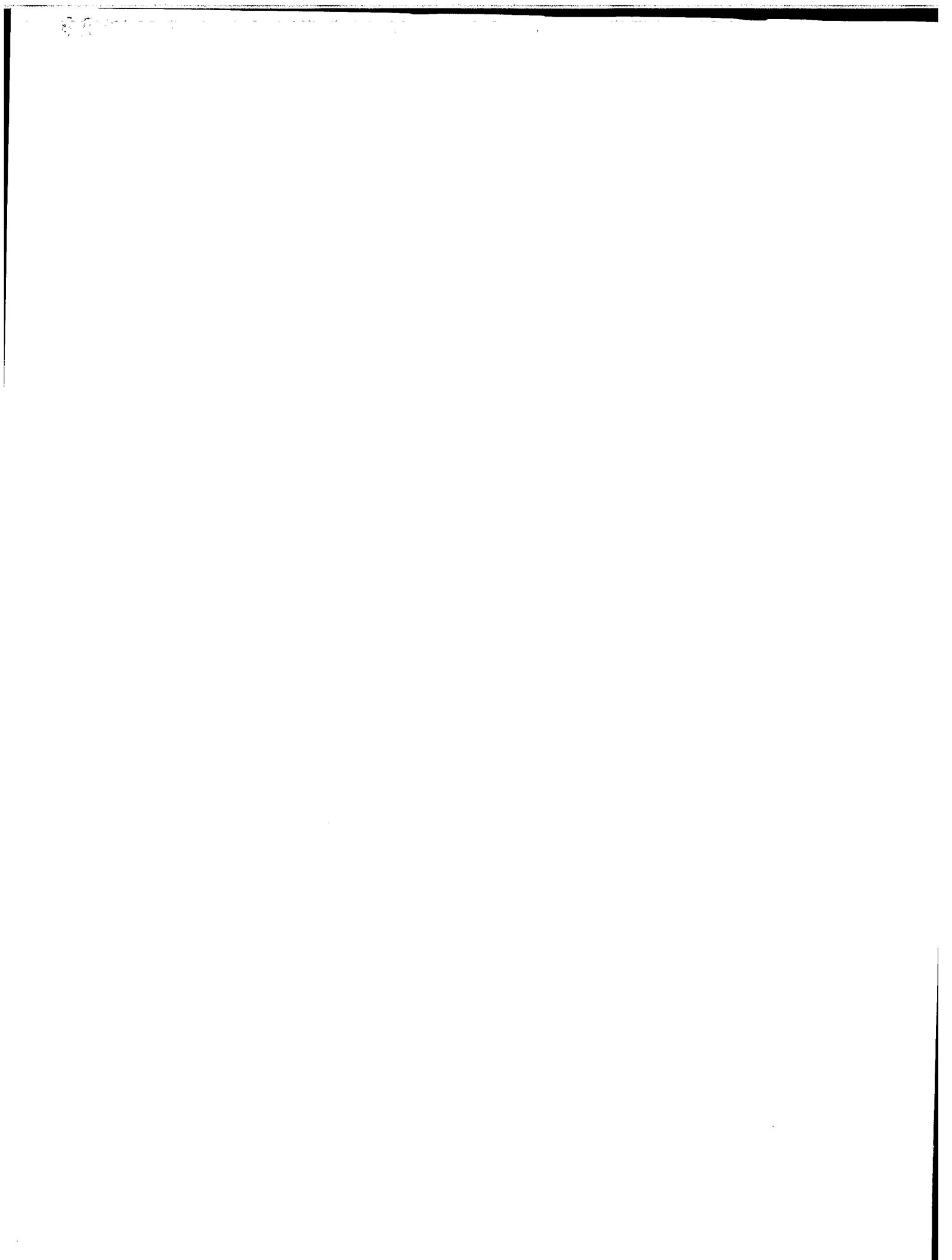
Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04008881.7

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:
Application no.: 04008881.7
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 14.04.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
124 Grenzacherstrasse
4070 Basel
SUISSE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Expressionssystem zur Herstellung von IL-15/Fc-Fusionsproteinen und ihre
Verwendung

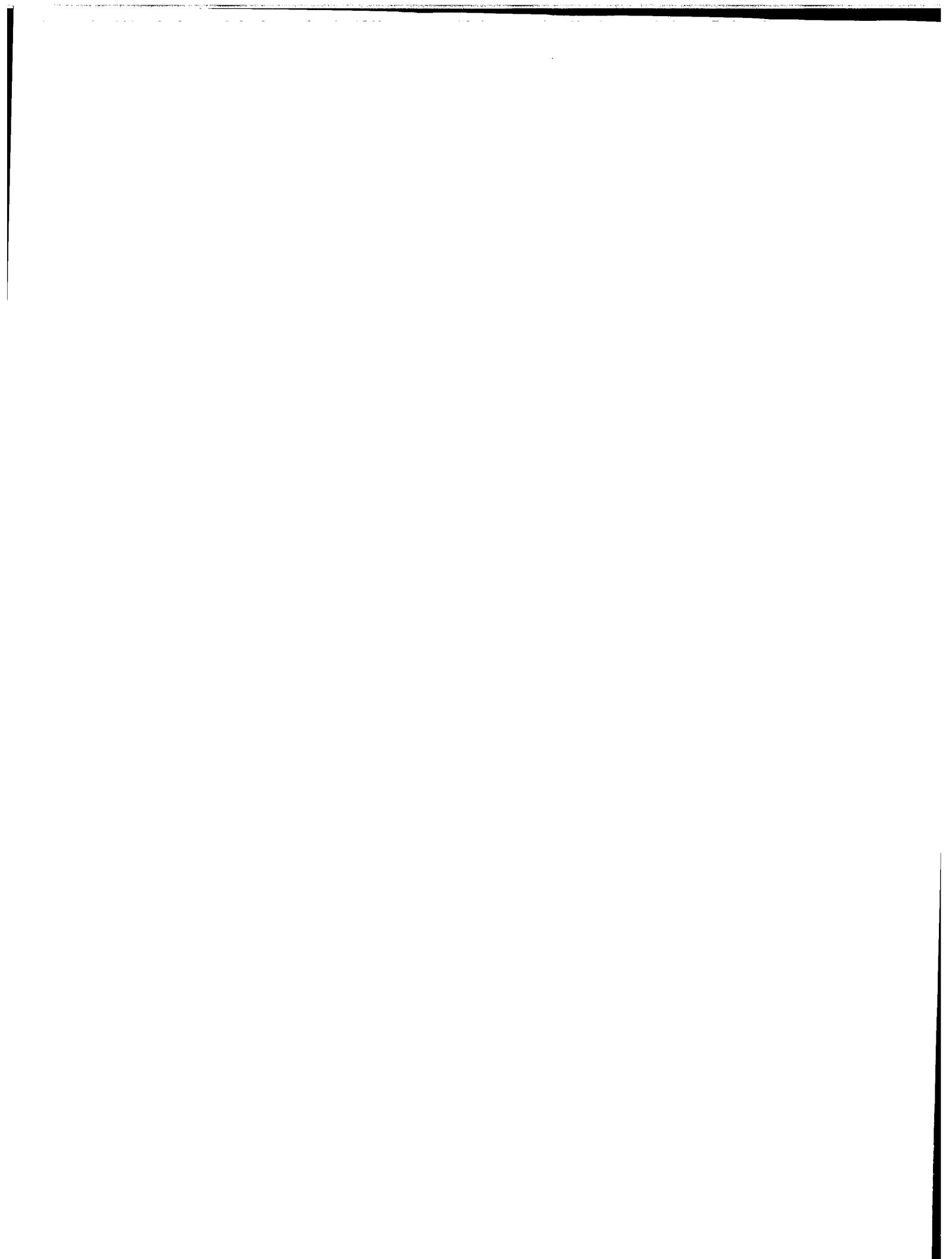
In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C12N15/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignés lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PL PT RO SE SI SK TR LI



- 1 -

F. Hoffmann-La Roche AG

14. April 2004
C62387EP BÖ/ATE/hmü**Expressionssystem zur Herstellung von IL-15/Fc-Fusionsproteinen und ihre Verwendung**

5 Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem, das mindestens eine Nukleinsäure für ein Interleukin-15/Fc- (IL-15/Fc) -Fusionsprotein umfasst und mit dessen Hilfe das IL-15/Fc-Fusionsprotein hergestellt werden kann. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines IL-15/Fc-Fusionsproteins unter Verwendung des Expressionssystems sowie die Verwendung des Expressionssystems, der Nukleinsäure, der Wirtszelle oder des CD5-
10 Leaders zur Expression von Proteinen in Wirtszellen.

In Säugetieren beruht das Immungeschehen auf einer Vielzahl komplexer zellulärer und azellulärer Interaktionen, die im Sinne eines Immun-Netzwerks funktionieren. Viele Mechanismen innerhalb dieses komplexen Netzwerks sind erst in jüngerer Zeit in ihrer 15 Funktion aufgeklärt worden. Eine Schlüsselrolle als lösliche Botenstoffe innerhalb des Immun-Netzwerks spielen Cytokine, zu denen der 1994 beschriebene Faktor Interleukin-15 (Grabstein *et al.*, 1994, Science 264: 965-968) gehört. Interleukin-15 (IL-15) beeinflusst als Immunmodulator, Wachstumsfaktor, Chemokin und Überlebensfaktor die Proliferation, Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, 20 Monocyten/Makrophagen, NK-Zellen und weiteren IL-15-sensitiven Zellen des Gewebes, wie Keratinocyten und anderen. Neben seiner Funktion als Immunmodulator spielt IL-15 auch eine Rolle bei der Regulation des Metabolismus von Muskel- und Fettgewebe.

Typischerweise bindet IL-15 an seine Effektorzellen über den heterotrimeren Interleukin-15-Rezeptor (IL-15R). Der IL-15R besteht aus einer spezifisch an IL-15 bindenden α -Untereinheit, einer ebenfalls durch IL-2 erkannten β -Untereinheit und einer γ -Untereinheit, die ebenfalls von weiteren Mitgliedern der Interleukin-Familie wie IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 erkannt wird.

IL-15 spielt eine Rolle bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Rheumatischer Arthritis, Psoriasis, Multipler Sklerose,

Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Enterocolitis, pulmonärer Sarcoidose oder systemischem Lupus Erythematoses, sowie bei der immunologischen Abstoßung transplanterter Organe, Gewebe und Zellen. Ebenso spielt IL-15 eine Rolle bei lymphoiden Leukämien.

- 5 Ein therapeutischer Einsatz von Interleukin-15 erfolgt entweder nach agonistischem Prinzip zur Expansion von Lymphozytenpopulationen bei Krebspatienten und bei Immundefizienz-Erkrankungen oder bei Erkrankungen mit einer pathologischen Aktivierung des Immunsystems nach antagonistischem Prinzip durch Einsatz von Agenzien, die die Wirkung von IL-15 blockieren. Dabei kann es sich um lösliche IL-15-Rezeptor-Polypeptide, gegen IL-15 oder den
10 IL-15-Rezeptor gerichtete Antikörper oder um Fusionsproteine mit einem IL-15-Anteil wie z.B. ein Fusionsprotein, das eine IL-15-Komponente und eine Immunglobulin-Komponente enthält, handeln (Übersicht in Fehniger und Caligiuri, 2001, Blood 97(1): 14-32). Die Interleukin-Immunglobulin-Fusionsproteine haben sich hierbei als vorteilhaft erwiesen.
- 15 Rekombinante Fusionsproteine aus Interleukinen und Immunglobulinen können in prokaryotischen Expressionssystemen hergestellt werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser Expressionssysteme ist die fehlende Glykosilierung der prokaryotisch hergestellten Proteine, die zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität und Stabilität des exprimierten Produkts führen kann und damit die medizinische Verwendbarkeit der Expressionsprodukte einschränkt. Die Herstellung
20 rekombinanter Fusionsproteine aus Interleukinen und Immunglobulinen in alternativen Expressionssystemen, wie z.B. Säugerzellen, die in der Regel eine korrekte Glykosilierung gewährleisten, ist hingegen mit dem Problem einer vergleichsweise geringen Expressionseffizienz behaftet (Zheng *et al.*, 1999, J. Immunol. 163: 4041-4048). Daher besteht ein Bedarf, ein Expressionssystem für Eukaryonten bereitzustellen, mit dem eine Herstellung großer Mengen
25 rekombinanter IL-15/Fc-Fusionsproteine in ausreichender Reinheit möglich ist.
- Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es somit, ein derartiges, verbessertes Expressionssystem bereitzustellen.
- 30 Die Aufgabe wurde gelöst durch die Bereitstellung eines Expressionssystems zur Herstellung eines IL-15/Fc-Fusionsproteins, enthaltend eine oder mehrere Nukleinsäure(n) umfassend

- a) mindestens eine Nukleinsäure für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein,
- b) mindestens einen Promotor und
- c) mindestens eine Nukleinsäure für einen CD5-Leader,

5

wobei der Promotor und die Nukleinsäure für den CD5-Leader funktionsfähig mit der Nukleinsäure für das IL-15/Fc-Fusionsprotein verknüpft sind.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Expressionssystems ist es möglich, IL-15/Fc-Fusionsproteine
10 z.B. in Eukaryonten mittels rekombinanter DNA-Technologie in größerem Maßstab herzustellen. Damit ermöglicht die vorliegende Erfindung eine Herstellung von IL-15/Fc-Fusionsproteinen für kommerzielle Zwecke.

Unter rekombinanter DNA-Technologie werden im Allgemeinen Technologien zur Übertragung genetischer Informationen z.B. auf Vektoren verstanden. Diese Vektoren ermöglichen
15 eine Weiterverarbeitung der genetischen Information, zum Beispiel durch Einbringung in einen Wirt, was sowohl die Vervielfältigung als auch die Expression der genetischen Information in einer neuen Umgebung ermöglicht. Im Allgemeinen liegt die genetische Information in Form von Nukleinsäuren vor, zum Beispiel in Form von genomischer DNA oder von cDNA, die die
20 Information für ein oder mehrere gewünschte Genprodukte in kodierter Form enthält. Als Vektoren können beispielsweise Plasmide fungieren, in die Nukleinsäuren wie beispielsweise cDNA integriert werden können, um sie zu vervielfältigen und, gegebenenfalls unter Kontrolle transkriptionsregulatorischer Elemente wie z. B. Promotoren, Enhancern oder Silencern, zur
25 Expression in einer Wirtszelle zu bringen. Plasmide können weitere Elemente enthalten, die sowohl die Synthese des gewünschten Expressionsprodukts als auch seine Stabilität und Lokalisierung in der Wirtszelle beeinflussen oder eine Selektionierung des verwendeten Plasmids bzw. Expressionsprodukts ermöglichen.

Als Expressionssystem im Sinne der vorliegenden Erfindung wird eine oder mehrere
30 Nukleinsäure(n) - ggf. in Kombination mit weiteren Elementen, die zur Transkription erforderlich sein können, wie z.B. Ribosomen, Aminosäuren und/oder t-RNAs - bezeichnet,

wobei das Expressionssystem die Expression des IL-15/Fc-Fusionsproteins unter geeigneten Bedingungen z.B. in einer geeigneten Wirtszelle bewirken kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Expressionssystem aus der/den 5 genannten einen oder mehreren Nukleinsäuren.

Um die Expression in Wirtszellen zu ermöglichen, kann/können die Nukleinsäure(n) des Expressionssystems auch ein Bestandteil von einem oder mehreren Vektor(en) sein, welche(r) nach dem Fachmann bekannten Methoden der rekombinanten DNA-Technologie hergestellt 10 werden kann/können (Sambrook *et al.* (Hersg.), 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Press, New York). Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Vektoren bekannt, welche im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können. Für die Expression in eukaryotischen Zellen sind beispielsweise die Hefe-Vektoren pYES 15 (Expression in *S. cerevisiae*; Invitrogen) und pICZ (Expression in *P. pastoris*; Invitrogen) geeignet. Verwendbar sind auch Baculovirus-Vektoren wie pBacPAK9 (Expression in Insektenzellen; Clontech), sowie eine Reihe von Vektoren, die zur heterologen Expression in Säugerzellen eingesetzt werden, wie Rc/CMV, Rc/RSV, pcDNA und weitere SV40-abgeleitete Vektoren, in die neben den zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen geeignete transkriptions-regulatorische Elemente eingefügt werden können.

20 Geeignete Vektoren enthalten bevorzugt neben einem Replikationsursprung, der die Plasmidreplikation im gewählten Wirt vermittelt, im Allgemeinen selektionierbare Markergene, sowie Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, die die Insertion von Nukleinsäurefragmenten ermöglichen. Die für das IL-15/Fc-Fusionsprotein kodierende 25 Nukleinsäure kann über geeignete Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen in den Vektor eingebracht werden.

Virale Vektorsysteme, die ebenfalls für das erfindungsgemäßen Expressionssystem geeignet sind, umfassen beispielsweise retrovirale, adenovirale, adeno-assoziierte virale Vektoren, sowie 30 Herpesvirus- oder Papillomvirus-Vektoren.

Bei der für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein kodierenden Nukleinsäure handelt es sich vorzugsweise um eine DNA oder RNA, besonders bevorzugt um eine genomische DNA, eine cDNA oder Kombinationen davon.

5 Eine Nukleinsäure für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein kodiert für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein. Ein IL-15/Fc-Fusionsprotein gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das zwei Fusionsanteile enthält, nämlich eine IL-15-Komponente und eine Fc-Komponente. Rekombinante Proteine, die neben einem funktionellen Protein einen Fusionsanteil eines Immunglobulins enthalten, sind beispielsweise in Capon *et al.* (US 5,428,130) beschrieben.

10 Bevorzugt handelt es sich um ein Fusionsprotein, das aus einem N-terminalen mutierten oder nicht-mutierten IL-15-Teil und einem C-terminalen Fc-Teil besteht. Sólche Proteine sind z.B. in WO 97/41232 und Kim *et al.* (1998, J. Immunol. 160:5742-5748) offenbart.

15 Der IL-15-Teil des Fusionsproteins vermittelt eine selektive Bindung an den IL-15-Rezeptor (IL-15R), der z.B. auf aktivierten T-Zellen exprimiert ist. Der IL-15-Teil kann daher sowohl ein natürlich vorkommendes IL-15 als auch eine Mutante hiervon sein.

20 In einer stärker bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der IL-15-Komponente um das Wildtyp-IL-15. Hierbei kann es sich bei dem IL-15 um ein IL-15 einer jeden Spezies, wie z.B. der Maus, der Ratte, des Meerschweinchens, des Kaninchens, der Kuh, der Ziege, des Schafes, des Pferdes, des Schweins, des Hundes, der Katze oder des Affen, vorzugsweise des Menschen handeln. Eingeschlossen sind auch unterschiedliche Spleißvarianten sowie natürlich auftretende Varianten. Besonders bevorzugt sind hierbei Nukleinsäuren aus Säugetieren, insbesondere die humane oder die murine Form der Nukleinsäuren.

25 Mutanten des IL-15 schließen IL-15-Komponenten ein, die gegenüber dem natürlich vorkommenden IL-15 eine Mutation aufweisen wie z.B. eine oder mehrere Deletionen, Insertionen oder Substitutionen oder Kombinationen hiervon. Allerdings muss die verwendete IL-15-Variante das IL-15/Fc-Fusionsprotein zur Bindung an den IL-15R befähigen. Dies könnte beispielsweise in einem Radioligandbindungstest unter Verwendung von markiertem

IL-15 und Membranen oder Zellen, die IL-15-Rezeptoren aufweisen, überprüft werden (Carson WE et al., 1994, J Exp Med., 180(4): 1395-1403).

In einer bevorzugten Ausführungsform könnte es sich bei der Mutante eine solche Mutante handeln, die eine Wirkung wie IL-15 aufweist (agonistisch wirkende IL-15-Komponente), wobei deren Aktivität im Vergleich zu IL-15 gleich hoch, erniedrigt oder sogar erhöht sein kann. Als Testsystem für IL-15/Fc-Fusionsproteine, die eine agonistisch wirkende IL-15-Komponente besitzen, kann die Stimulation der Proliferation muriner CTLL-2-Zellen durch die IL-15-Komponente verwendet werden.

10

Eine agonistisch wirkende IL-15-Komponente im Sinne der vorliegenden Erfindung liegt vor, wenn die Komponente mindestens 10 %, vorzugsweise mindestens 25 %, noch weiter bevorzugt um mindestens 50 %, noch stärker bevorzugt 100 %, sogar noch stärker bevorzugt 150 % und am meisten bevorzugt mindestens 200 % Aktivität aufweist. Aktivität einer agonistisch wirkenden IL-15-Komponente meint die prozentuale Stimulation der Antwort durch die IL-15-Komponente im Vergleich zur Stimulation durch Wildtyp-IL-15 (Wildtyp-IL-15 entspricht 100 % Aktivität). In den Tests kann entweder die IL-15-Komponente alleine oder das Fusionsprotein eingesetzt werden.

20 Für agonistisch wirkende IL-15-Komponenten sind konservative Aminosäureaustausche bevorzugt, wobei ein Rest durch einen anderen mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt wird. Typische Substitutionen sind Substitutionen innerhalb der Gruppe der aliphatischen Aminosäuren, innerhalb der Gruppe der Aminosäuren mit aliphatischer Hydroxylseitenkette, innerhalb der Gruppe von Aminosäuren mit sauren Resten, innerhalb der Gruppe der 25 Aminosäuren mit Amidderivaten, innerhalb der Gruppe der Aminosäuren mit basischen Resten oder innerhalb der Aminosäuren mit aromatischen Resten. Typische konservative und halbkonservative Substitutionen sind:

Aminosäure	Konservative Substitution	Halb-konservative Substitution
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden antagonistisch wirkende IL-15-Komponenten eingesetzt. Solche Komponenten hemmen oder inhibieren die 5 Wirkung von IL-15 oder die Bindung von IL-15 an den IL-15R, wobei die Hemmung oder Inhibition vollständig oder nur partiell sein kann. Als Testsystem für IL-15/Fc-Fusionsproteine, die eine antagonistisch wirkende IL-15-Komponente besitzen, kann das in WO 97/41232 beschriebene Testsystem (BAF-BO3-Zellproliferationstest) verwendet werden. Eine antagonistisch wirkende IL-15-Komponente im Sinne der vorliegenden Erfindung liegt vor, 10 wenn die Komponente mindestens 10 %, vorzugsweise mindestens 25 %, noch weiter bevorzugt mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 95 % der IL-15-medierten Wirkung oder IL-15-Bindung an den IL-15R hemmt oder inhibiert. In den Tests kann entweder die IL-15-Komponente alleine oder das Fusionsprotein eingesetzt werden.

Für antagonistisch wirkende IL-15-Komponenten sind nicht konservative Aminosäureaustausche bevorzugt, wobei ein Rest durch einen anderen mit anderen Eigenschaften ersetzt wird. Weiter bevorzugt finden diese Austausche in Bereichen des Moleküls statt, die für die Wechselwirkung mit dem IL-15-R oder für die Signalweiterleitung verantwortlich sind.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden als antagonistisch wirkende IL-15-Komponenten die in WO 97/41232 beschriebenen Mutanten des IL-15 oder eine IL-15-Komponente mit einer Mutation an der Aminosäureposition 56 (Aspartat; AAA21551) verwendet. Höchst bevorzugte Mutanten sind die, bei denen Punktmutationen an den 10 Aminosäurepositionen 149 und/oder 156 des Interleukins-15 von Glutamin zu insbesondere Aspartat eingeführt wurden (siehe WO 97/41232). Die beschriebenen Mutationen können in einer Ausführungsform auch kombiniert werden.

In einer Ausführungsform ist der mutierte IL-15-Teil des Fusionsproteins zu mindestens 65 %, 15 vorzugsweise mindestens 70 %, weiter bevorzugt mindestens 85 %, noch weiter bevorzugt mindestens 95 % und am meisten bevorzugt mindestens 99 % identisch mit dem einem Wildtyp-IL-15, vorzugsweise einem humanen Wildtyp-IL-15 (z.B. Datenbank des National Center for Biotechnology Information, Zugangsnummer AAA21551) oder auch anderen natürlich vorkommenden Varianten (z.B. die Varianten mit den Zugangsnummern CAA63914 20 oder CAA71044 der Datenbank des National Center for Biotechnology Information).

Als zweite funktionelle Einheit des IL-15/Fc-Fusionsproteins ist eine Fc-Komponente vorhanden. Unter dem Fc-Teil versteht man das durch Papainspaltung darstellbare, in der Aminosäuresequenz stark konservierte, konstante (c = constant) Fragment der Immunglobuline. 25 Das Fc-Fragment ist das Fragment des Antikörpers, das üblicherweise keine Antigene bindet. Unter einem Fc-Teil gemäß der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise auch ein wie oben definiertes Fragment eines Immunglobulins verstanden, das darüber hinaus neben der Hinge-Region auch die konstanten Domänen CH2 und CH3 umfasst.

- Die Fc-Komponente ist aus dem Fc-Teil eines beliebigen Antikörpers, z.B. eines IgA, IgD, IgG, IgE oder IgM, vorzugsweise eines IgM oder eines IgG, mehr bevorzugt aus einem Fc-Teil der Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 oder IgG4, abgeleitet.
- 5 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Fc-Teil des Fusionsproteins um ein Fc-Fragment eines Immunglobulins G (IgG), dem die leichten Ketten und die schweren Ketten der IgG-variablen Region fehlen. Beispiele für einsetzbare IgGs sind IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 oder IgG4. Bevorzugt ist humanes oder murines IgG1.
- 10 Für die vorliegende Erfindung kann der gesamte Fc-Teil des Antikörpers oder nur ein Teil hiervon verwendet werden. Allerdings sollte der Teil des Fc-Teil vorzugsweise so gestaltet sein, dass das IL-15/Fc-Fusionsprotein eine größere Halbwertszeit für die Zirkulation im Blut besitzt als die IL-15-Komponente ohne Immunglobulin-Komponente. Um dies zu testen, kann einem oder mehreren Versuchstieren das Fusionsprotein und die IL-15-Komponente verabreicht z.B. 15 in die Blutbahn injiziert werden und die Halbwertszeiten für die Zirkulation im Blut verglichen werden. Eine größere Halbwertszeit liegt vor, wenn die Halbwertszeit erhöht ist, vorzugsweise mindestens um 10 %, weiter bevorzugt mindestens um 20 %, noch weiter bevorzugt um mindestens 50 % und am meisten bevorzugt um mindestens 100 %.
- 20 Der Fc-Teil kann auch ein Fc-Teil mit mindestens einer Mutation sein. Das mutierte Fc kann in der Weise mutiert sein, wie dies oben für den IL-15-Teil beschrieben ist.
- In einer Ausführungsform ist der mutierte Fc-Teil des Fusionsproteins zu mindestens 65 %, vorzugsweise mindestens 70 %, weiter bevorzugt mindestens 85 %, noch weiter bevorzugt 25 mindestens 95 % und am meisten bevorzugt mindestens 99 % identisch mit dem Fc-Teil eines murinen oder humanen Wildtyp-Immunglobulins, vorzugsweise dem human IgG1-Fc oder auch natürlich vorkommenden Varianten.
- In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung liegt der Fc-Anteil des Fusionsproteins in 30 nativer Form oder mit konservativen Aminosäureaustauschen vor und enthält intakte FcR- und/oder Komplement-Bindungsstellen. Der Fc-Anteil des Fusionsproteins kann sowohl die

Aktivierung des Komplementsystems, als auch die Bindung an Fc-Rezeptor-exprimierende Zellen vermitteln und damit zur Depletion der durch den IL-15-Anteil des Fusionsproteins erkannten Zellen führen. Durch Einführung von Mutationen, insbesondere von nicht-konservativen Aminosäureaustauschen, an den Aminosäurepositionen, die die Komplementaktivierung und die 5 Fc-Rezeptorbindung vermitteln, können diese Funktionen ausgeschaltet werden. Dies sind beispielsweise Mutationen der Bindungsstelle für den Fc-Rezeptor (FcR) bzw. den Komplementbindungsstellen (an den Aminosäurepositionen 214, 356, 358 und/oder 435 im nativen humanen IgG1 oder Leu 235, Glu 318, Lys 320 und/oder Lys 322 im nativen murinen 10 IgG2A). Werden Aminosäuren an diesen Positionen ausgetauscht, kommt es in der Regel zu einem Verlust der lytischen und komplementaktivierenden Funktion des Fc-Anteils (WO 97/41232).

Noch weiter bevorzugt ist eine Ausführungsform, in der die Aminosäure Cystein an Position 4 der Hinge-Region des humanen Fc-Teils, weiter bevorzugt des humanen IgG1 (Position 167 von humanem IgG1), gegen Alanin ausgetauscht ist, beispielsweise um eine intermolekulare Brückenbildung und damit Aggregation des exprimierten IL-15/Fc-Fusionsproteins zu verhindern.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dem Fc-Teil des humanen 20 Immunglobulins IgG1 oder des murinen Immunglobulins IgG2A, der neben der Gelenkregion die Regionen CH2 und CH3 der schweren Kette umfasst.

In dem IL-15/Fc-Fusionsprotein ist die IL-15-Komponente an die Immunglobulin-Komponente entweder direkt oder über einen Linker fusioniert. Vorzugweise besteht der Linker aus höchstens 25 Aminosäuren, weiter bevorzugt aus höchstens 15 Aminosäuren, noch weiter bevorzugt aus höchstens 10 Aminosäuren und am meistens bevorzugt aus 1, 2, 3, 4 oder 5 Aminosäuren.

In einer noch anderen bevorzugten Ausführungsform wird eine humane, für ein Interleukin kodierende Nukleinsäure entweder mit einer ebenfalls humanen, für ein Fc kodierende 30 Nukleinsäure oder mit einer für ein Fc kodierenden Nukleinsäure aus anderen Spezies, wie z.B. Maus oder Ratte, kombiniert. Beispielsweise kann eine humane, für IL-15 kodierende

Nukleinsäure mit einer ebenfalls humanen, für IgG1 kodierenden Nukleinsäure, mit einer murinen, für IgG2A kodierenden Nukleinsäure, oder mit einer für IgG2B kodierenden Nukleinsäure aus der Ratte kombiniert werden. Weitere mögliche Kombinationen von Nukleinsäuren sind für den Fachmann ersichtlich.

5 Die am meisten bevorzugte Nukleinsäure für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein ist die Sequenz der Positionen 979 bis 2014 von SEQ ID NR. 1, die der Positionen 1985 bis 3020 von SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 oder eine Nukleinsäure, die für die Polypeptide der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert. Der am meisten bevorzugte Vektor umfassend eine Nukleinsäure für ein
10 IL-15/Fc-Fusionsprotein ist ein Vektor der SEQ ID NR. 1 oder SEQ ID NR. 2.

Umfasst von dem Begriff „Nukleinsäure für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein“ sind aber auch eine Nukleinsäure, die eine Sequenzidentität von mindestens ca. 60 %, vorzugsweise ca. 75 %, besonders bevorzugt ca. 90 % und insbesondere ca. 95 % zu der in SEQ. ID Nr. 3 angegebenen
15 Nukleotidsequenz oder einer Nukleotidsequenz, die für die Polypeptide der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert, aufweist, wobei die entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsproteine an den IL-15R binden und eine erhöhte Halbwertszeit im Blut gegenüber dem entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsprotein ohne Immunglobulinkomponente aufweisen (Testsysteme siehe oben).

20 Umfasst von dem Begriff „Vektor umfassend eine Nukleinsäure für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein“ ist auch eine Nukleinsäure, die eine Sequenzidentität von mindestens ca. 60 %, vorzugsweise ca. 75 %, besonders bevorzugt ca. 90 % und insbesondere ca. 95 % zu den in SEQ. ID NR. 1 und SEQ. ID NR. 2 angegebenen Nukleotidsequenzen aufweist, wobei die entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsproteine an den IL-15R binden und eine erhöhte Halbwertszeit
25 im Blut gegenüber dem entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsprotein ohne Immunglobulinkomponente aufweisen (Testsysteme siehe oben).

Das Expressionssystem umfasst weiterhin einen Promotor. Der Promotor und seine Funktionen sind dem Fachmann bekannt. Dieser kann aus z.B. Viren, Bakterien oder Eukaryonten abgeleitet sein. Der Promotor kann die Transkription des zu exprimierenden Gens konstitutiv steuern oder induzierbar sein und damit eine gezielte Regulation der Genexpression
30

ermöglichen. Weiterhin kann der Promotor zell- oder gewebespezifisch sein, d.h. die Expression des Genprodukts auf bestimmte Zelltypen beschränken. Promotoren mit diesen Eigenschaften sind dem Fachmann bekannt. Promotoren, die zur Steuerung der Expression in einer Wirtszelle besonders geeignet sind, sind beispielsweise der ADH2-Promotor für die Expression in Hefe, oder der Polyhedrinpromotor für die Expression in Insektenzellen. Promotoren, die eine starke Expression eines Genprodukts in Säugerzellen vermitteln, sind beispielsweise virale Promotoren viraler Gene, wie der RSV(Rous-Sarcoma-Virus)-Promotor, der SV 40(Simian Virus 40)-Promotor sowie der CMV*i/e*(Cytomegalovirus Immediate Early Polypeptid)-Promotor. Der CMV-Promotor ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Auch eingeschlossen sind Mutationen im CMV-Promotor, wobei die mutierte Sequenz bevorzugt zu 95 %, weiter bevorzugt zu 99 %, homolog zum natürlich vorkommenden CMV-Promotor (Kouzarides et al., 1983, Mol Biol. Med. 1(1): 47-58) ist und/oder die Aktivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Promotor bevorzugt 90 bis 110 %, weiter bevorzugt 95 bis 105 % beträgt.

15

Zusätzlich kann der transkriptionsregulatorische Bereich, insbesondere bei Verwendung des CMV-Promotors, ein oder mehrere Introns, vorzugsweise das Intron A (Chapman et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19(14): 3979-3986), enthalten. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, dass besonders hohe Mengen an IL-15/Fc-Fusionsproteinen erzielt werden können, beispielsweise durch Präsentation geeigneter Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Auch eingeschlossen sind Mutationen im Intron A, wobei die mutierte Sequenz bevorzugt zu 80 %, weiter bevorzugt zu 90 % und noch weiter bevorzugt zu 95 %, homolog zu einem natürlich vorkommenden Intron, insbesondere Intron A (Chapman et al., 1991, Nucleic Acids Res. 19(14): 3979-3986), ist und/oder die Aktivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Intron, insbesondere Intron A, bevorzugt 90 bis 110 %, weiter bevorzugt 95 bis 105 % beträgt.

Ein weiteres Element des erfindungsgemäßen Expressionssystems ist eine Nukleinsäure für einen CD5-Leader, d.h. für die sekretorische Signalsequenz des Lymphocytantigens CD 5 (Jones et al., 1986, Nature 323 (6086): 346-349). Diese sekretorische Signalsequenz vermittelt die Sekretion des Expressionsprodukts in das Kulturmedium der Wirtszelle. Der Nukleinsäure für den CD5-Leader und das IL-15/Fc-Fusionsprotein sind im dem Expressionssystem so

angeordnet, dass der Leader die Sekretion des Fusionsproteins vermitteln kann. Vorzugsweise ist der CD5-Leader nach Transkription und Translation im Expressionsprodukt carboxyterminal, genauso bevorzugt aber auch aminoterminal, vom Fusionsprotein lokalisiert.

5 Es zeigte sich überraschenderweise, dass der CD5-Leader in CHO-Zellen eine 200- bis 300-fach höhere Sekretion des Expressionsprodukts ins Zellkulturmedium vermittelt als vergleichbare Signalsequenzen (siehe Beispiel 2, Fig. 8). Auch eingeschlossen sind Mutationen im CD5-Leader, wobei die mutierte Sequenz zu bevorzugt 80 %, weiter bevorzugt zu 90 % und noch weiter bevorzugt zu 95 %, homolog zum natürlich vorkommenden CD5-Leader (Jones *et al.*, 1986, Nature 323 (6086): 346-349) ist und/oder die Aktivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp-CD5-Leader bevorzugt 80 bis 120 %, weiter bevorzugt 90 bis 110 % und noch weiter bevorzugt 95 bis 105 % beträgt.

In dem Expressionssystem sind der Promotor und die Nukleinsäure für den CD5-Leader 15 funktionsfähig mit der Nukleinsäure für das IL-15/Fc-Fusionsprotein verknüpft. Unter funktionsfähig verknüpft wird verstanden, dass Promotor und die Nukleinsäure für den Leader in Bezug auf die Nukleinsäure für das Fusionsprotein so angeordnet sind, dass sie ihre Funktion ausüben können. Die Funktion des Promotors besteht in der Regulation der Expression des Fusionsproteins. Wenn beide auf einer Nukleinsäure lokalisiert sind, wird der Promotor sich 20 üblicherweise 5', aber auch 3', vom Fusionsprotein befinden. Die Funktion des Leaders besteht darin, die Sekretion des Fusionsproteins zu vermitteln. Wenn die Nukleinsäure für den Leader und das Fusionsprotein auf einer Nukleinsäure lokalisiert sind, wird der Leader üblicherweise das Fusionsprotein flankieren. Bevorzugterweise wird unter „funktionsfähig verknüpft“ verstanden, dass der Promotor und der CD5-Leader in Relation zum Fusionsprotein so 25 angeordnet sind, dass der Promotor die Expression des Fusionsproteins reguliert und der CD5-Leader die Sekretion des Fusionsproteins bewirkt.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Expressionssystem zusätzlich mindestens 30 eine Nukleinsäure für ein selektionierbares Markergen, das eine Selektion z.B. der mit dem Expressionssystem transfizierten Wirtszelle gegenüber nicht-transfizierten Zellen ermöglicht. Markengene sind z.B. resistenzvermittelnden Gene, die in Kombination mit einem

Antibiotikum eingesetzt werden. Dieses Gen wird z.B. in einen Expressionsvektor insertiert und mit einem auf die entsprechend transfizierte Wirtszelle angewandten Antibiotikum eingesetzt. Bekannte zur Selektion eukaryotischer Wirtszellen eingesetzte Antibiotika sind beispielsweise Ampicillin, Kanamycin, Zeocin oder in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung 5 Neomycin, die eine Selektion von Wirtszellen ermöglichen, indem das entsprechende Resistenzvermittelnde Gen exprimiert wird. Dem Fachmann sind weitere Markergene bekannt, bei denen beispielsweise die selektiven Gene tk oder DHFR mit einer Anwendung der entsprechenden selektionierender Agenzien wie HAT bzw. Aminopterin und Methotrexat kombiniert werden. Weitere geeignete selektionierbare Markergene, wie beispielsweise das 10 "Green-Fluorescent-Protein"-Gen aus *A. victoria* und Varianten davon, erlauben eine optische Selektionierung einer mit dem Expressionsvektor transfizierten Wirtszelle, ohne dass die Wirtszelle mit selektionierenden Agenzien behandelt wird.

Bevorzugt wird das für das Enzym Tryptophansynthetase kodierende Gen als selektionierbares 15 Markergen verwendet, wobei das entsprechende Expressionsplasmid zur Selektion und Expression in eine Tryptophansynthetase-defiziente Wirtszelle eingebracht wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Expressionssystem auch 20 mindestens eine Nukleinsäure für ein Polyadenylierungssignal, das üblicherweise neben der Termination der Transkription auch einen Einfluss auf die Stabilität der RNA-Transkripte hat. Beispiele hierfür sind die Polyadenylierungssequenzen aus SV 40, aus dem β-Globin-Gen oder 25 in einer bevorzugten Ausführungsform aus dem bovinen Wachstumshormon-Gen BGH (EP 173552). Die Nukleinsäure für das Polyadenylierungssignal ist in der Art Teil des Expressionssystems, dass es in der Lage ist, die Expression des Fusionsproteins oder seine Stabilität zu verbessern. Üblicherweise ist sie mit der Nukleinsäure für das Fusionsprotein verbunden, so dass das Transkriptionsprodukt die für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein kodierende 30 Nukleinsäure und das Polyadenylierungssignal umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform z.B. für die Transkription und/oder Translation in 35 einem zellfreien System enthält das Expressionssystem zusätzlich zu den oben genannten Bestandteilen Komponenten, die zur Expression benötigt werden. Beispiele für solche mögliche

Komponenten sind Transkriptionsfaktoren, Enzyme (z.B. Peptidyl-Transferase, Aminoacyl-tRNS-Synthetase und RNA-Polymerasen) und andere zelluläre Proteine (z.B. eIF4E, eFE1 und eEF2) sowie weitere Hilfsstoffe (ATP, GTP und Magnesiumionen,), vorzugsweise t-RNAs, Aminosäuren und/oder Ribosomen.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Expressionssystem nur eine Nukleinsäure, die die Komponenten a) bis c) und ggf. d), die alle wie oben definiert sind, enthält.
- 10 10. In einer hoch bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält das Expressionssystem eine Nukleinsäure einer der Sequenzen SEQ ID NR. 1, SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 oder eine Nukleinsäure, die für ein Polypeptid der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert. Umfasst ist aber auch eine Nukleinsäure, die eine Sequenzidentität von mindestens ca. 60 %, vorzugsweise ca. 75 %, besonders bevorzugt ca. 90 % und insbesondere ca. 95 % zu einer der in den SEQ ID
- 15 15. NR. 1, SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleotidsequenzen oder einer Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert, aufweist, wobei die entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsproteine an den IL-15R binden und eine erhöhte Halbwertszeit im Blut gegenüber dem entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsprotein ohne Immunglobulinkomponente aufweisen (Testsysteme siehe oben).
- 20 20. In einer höchst bevorzugten Ausführungsform umfasst das Expressionssystem eine Nukleinsäure auf der von 5' nach 3' die folgenden Bestandteile angeordnet sind: CMV-Promotor und ggf. darauf folgend Intron A, CD5-Leader, IL-15/Fc-Fusionsprotein, insbesondere bestehend aus einem IL-15 mit Punktmutationen an den Aminosäurepositionen 149 und/oder 156 des IL-15 von Glutamin zu Aspartat (siehe WO 97/41232) und einem Fc-Teil des humanen IgG1, bei dem der die Aminosäure Cystein an Position 4 der Hinge-Region gegen Alanin ausgetauscht ist, ggf. ein Polyadenylierungssignal und ggf. mindestens ein Markergen. Insbesondere das Markergen kann auch auf einer zweiten Nukleinsäure angeordnet sein. Damit ist auch eine derartige Nukleinsäure (mit oder ohne Markergen) bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäure.
- 25
- 30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die das IL-15/Fc-Fusionsprotein, den Promotor, den CD5-Leader, ggf. das selektionierbare Markergen und ggf. das Polyadenylierungssignal umfasst, wobei alle Komponenten wie oben beschrieben sind. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Nukleinsäure die Sequenz von SEQ ID Nr. 1, 5 SEQ ID Nr. 2 oder 3 oder eine Nukleinsäure, die für ein Polypeptid der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert. Umfasst ist aber auch eine Nukleinsäure, die eine Sequenzidentität von mindestens ca. 60 %, vorzugsweise ca. 75 %, besonders bevorzugt ca. 90 % und insbesondere ca. 95 % zu einer der in den SEQ ID NR. 1, SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleotidsequenzen oder einer Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert, aufweist, wobei die entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsproteine an den IL-15R binden und eine erhöhte Halbwertszeit im Blut gegenüber dem entsprechenden IL-10 15/Fc-Fusionsprotein ohne Immunglobulinkomponente aufweisen (Testsysteme siehe oben).
10
15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, die ein erfindungsgemäßes Expressionssystem oder eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

Als Wirtszellen können eukaryotische Zellen wie Hefezellen (z.B. *S. cerevisiae*, *P. pastoris*), Insektenzellen (z.B. Sf9) oder Säugerzellen verwendet werden. Beispiele solcher Säugerzellen sind die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293, die aus Ovarienzellen des chinesischen Hamsters hergestellte Zelllinie CHO und ihre Derivate, wie z.B. CHO-K1 und CHO-DHFR, die Zelllinien BHK, NIH 3T3, HeLa, COS-1, COS-7 oder NS.1. Vorzugsweise handelt es sich um eine Säugerzelle, weiter bevorzugt um eine CHO-Zelle oder deren Derivate, am meisten bevorzugt um eine CHO-K1-Zelllinie:
20
25
30

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Wirtszelle um solche Zellen, die mit der/den Nukleinsäure(n) des Expressionssystems stabil transfiziert sind. Bei stabil transfizierten Zellen wird das Expressionssystem in das Genom der Zielzelle eingebaut und verbleibt stabil im Genom. Das übertragene Gen wird hier im Gegensatz zur transienten Transfektion nicht nur nicht abgebaut, sondern bei jeder Zellteilung verdoppelt und an die Tochterzellen weitergegeben. Diese behalten damit die Fähigkeit, das gewünschte Protein über einen langen Zeitraum hinweg herzustellen.

Verfahren zum Herstellen transfizierter, insbesondere stabil transfizierter, Zellen sind dem Fachmann bekannt. Die Transformation der Wirtszelle kann beispielsweise mittels Elektroporation, bei der durch kurzzeitiges Anlegen eines elektrischen Feldes eine Permeabilisierung der Zellmembran die Aufnahme von Nukleinsäuren in die Zelle erlaubt, oder durch Transfektion oder Infektion mit einem viralen Vektor erfolgen. Neben einer transienten Expression des rekombinanten Proteins kann das verwendete Expressionssystem auch eine klonale Selektionierung der transfizierten Wirtszellen erlauben, so dass klonale Zelllinien mit einer geeigneten Expressionseffizienz selektiert werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Wirtszelle um eine eukaryotische Säugerzelle, die mindestens eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID NR. 1, SEQ ID NR. 2 oder SEQ ID NR. 3 oder eine Nukleinsäure, die für die Polypeptide der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert, enthält. Umfasst sind auch die Nukleinsäuren, die eine Sequenzidentität von mindestens ca. 60 %, vorzugsweise ca. 75 %, besonders bevorzugt ca. 90 % und insbesondere ca. 95 % zu den genannten Sequenzen aufweisen, wobei die entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsproteine an den IL-15R binden und eine erhöhte Halbwertszeit im Blut gegenüber dem entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsprotein ohne Immunglobulinkomponente aufweisen (Testsysteme siehe oben).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Wirtszelle um eine Zelle der Linie CHO-K1 (Subklon von Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters), die mit mindestens einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID NR. 1, SEQ ID NR. 2 und/oder SEQ ID NR. 3 oder einer Nukleinsäure, die für die Polypeptide der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert, stabil transfiziert ist. Umfasst sind auch die Nukleinsäuren, die eine Sequenzidentität von mindestens ca. 60 %, vorzugsweise ca. 75 %, besonders bevorzugt ca. 90 % und insbesondere ca. 95 % zu den genannten Sequenzen aufweisen, wobei die entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsproteine an den IL-15R binden und eine erhöhte Halbwertszeit im Blut gegenüber dem entsprechenden IL-15/Fc-Fusionsprotein ohne Immunglobulinkomponente aufweisen (Testsysteme siehe oben).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines wie oben definierten IL-15/Fc-Fusionsproteins, umfassend

- 5 a. Bereitstellen einer wie oben beschriebenen Wirtszelle,
- b. Kultivieren der Wirtszelle,
- c. gegebenenfalls Selektionieren und
- d. Isolieren des exprimierten IL-15/Fc-Fusionsproteins.

Als Wirtszellen können beispielsweise die oben beschriebenen Zellen verwendet werden.

- 10 10 Vorzugsweise handelt es sich um eine Säugerzelle, weiter bevorzugt um eine CHO-Zelle oder deren Derivate, am meisten bevorzugt um eine CHO-K1-Zelllinie. Die Transfektion einer geeigneten Wirtszelle mit den für das IL-15/Fc-Fusionsprotein kodierenden Nukleinsäuren kann nach Standardmethoden erfolgen (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).
- 15 15 Bei den transfizierten Wirtszellen kann es sich sowohl um adhärente Zellen als auch um eine Suspensionskultur handeln. Vorteilhafterweise liegen die verwendeten Wirtszellen in Suspensionskultur vor, was eine Verringerung der Expressionseffizienz während der Adaptation von adhärenten Zellen zu Suspensionszellen vermeidet.
- 20 20 Die Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien kann nach Standardmethoden (Freshney, 1993, *Animal Cell Culture: A practical approach*, John Wiley & Sons, Inc.) in geeigneten Nährmedien unter Fermentationsbedingungen erfolgen, die den Anforderungen der jeweils verwendeten Wirtszellen hinsichtlich Salzkonzentration, pH-Wert, Vitaminen, Spurenelementen, selektionierenden Agenzien, Temperatur, Belüftung etc. angepasst sind und eine optimale Expression des gewünschten Expressionsprodukts ermöglichen. Vorteilhafterweise werden Nährmedien verwendet, die frei von Serum bzw. Fremdproteinen sind und eine höhere Reinheit des Expressionsproduktes gewährleisten.

- 30 Unter Selektionierung, insbesondere klonalem Selektionieren, ist ein Verfahren zu verstehen, bei dem durch schrittweise Vereinzelung Wirtszellen mit gewünschten Eigenschaften vermehrt werden. Vorzugsweise werden mit dem Verfahren der klonalen Selektion solche Wirtszellklone

ausgewählt, die eine ausreichende Expressionshöhe und/oder ein hohes Glykosilierungsmuster und Sialysierungsstatus des Expressionsprodukts gewährleisten. Glykosilierungsmuster und Sialysierungsstatus beeinflussen unter anderem die Halbwertzeit, Biodistribution, Immunogenität und das Aufreinigungsverhalten des Expressionsprodukts. Geeignete Verfahren zur Bestimmung des Glykosilierungsmusters und Sialinsäurestatus sind dem Fachmann bekannt und umfassen unter anderem kombinierte enzymatische Spaltungen mit IEF (isoelektrische Fokussierung), sowie HPAEC-PAD (High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection).

Weiterhin umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die Isolierung der heterolog exprimierten IL-15/Fc-Fusionsproteine aus den Wirtszellen bzw. in einer bevorzugten Ausführungsform aus dem Kulturmedium der Wirtszellen. Die Isolierung und ggf. Aufreinigung rekombinanter Polypeptide kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen, die beispielsweise Zelllyse, differentielle Zentrifugation, Fällung, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, HPLC Reverse-Phase-Chromatographie etc. umfassen. Eine geeignete Methode zur Aufreinigung rekombinanter Proteine ist beispielsweise die Affinitätschromatographie, bei der eine unlösliche Matrix durch chemische Behandlung einen Liganden binden kann. Als Ligand kann jedes Molekül mit einer aktiven chemischen Gruppe dienen, die an die Matrix zu binden vermag. Der Ligand wird im Allgemeinen so gewählt, dass er das aufzureinigende Polypeptid in reversibler Form zu binden vermag. Das aufzureinigende Molekül wird im vorgereinigten Kulturmedium der Wirtszellen unter Bedingungen, die seine Bindung an den Liganden begünstigen, auf die Matrix appliziert, ein nachfolgender Waschschnitt bewirkt die Entfernung von ungebundenen Molekülen aus dem Kulturmedium. Die Elution des aufzureinigenden Polypeptids kann durch Auftragen einer Lösung erfolgen, die die Bindung des Polypeptids vom Liganden löst. Ein weiteres geeignetes Verfahren ist die Anionenaustauschchromatographie, bei der die Bindung der aufzureinigenden Polypeptide an die Matrix über einen positiven oder negativen Ladungsüberschuss erfolgen kann. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Aufreinigung der Expressionsprodukte zunächst durch Abtrennung des Zellkulturmediums von den Wirtszellen, dem ein Zentrifugations- und/oder Filtrationsschritt zur Entfernung von Zellresten folgen kann. Die Aufreinigung der rekombinanten IL-15/Fc-Fusionsproteine aus dem vorgereinigten

Kulturmedium der Wirtszellen wird in einer bevorzugten Ausführungsform mittels einer Kombination von Protein A-Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, an die sich gegebenenfalls eine Gelfiltration anschließt. Die Charakterisierung der so gewonnenen Expressionsprodukte hinsichtlich Menge, Identität und Reinheit kann 5 anschließend mittels dem Fachmann bekannten Methoden wie BCA, Bestimmung der optischen Dichte, SDS-PAGE, Western Blot, ELISA, Aminosäureanalyse, aminoterminaler Sequenzierung, Fingerprinting (MALDI), Molekulargewichtsbestimmung (HPLC-ESI) etc. vorgenommen werden.

10 Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Aufreinigung von IL-15/Fc aus einer Zusammensetzung umfasst die folgenden Schritte:

- 15 a) Auftragen der Zusammensetzung auf eine Affinitätschromatographiesäule und Eluieren eines ersten IL-15/Fc-Eluats von der Säule;
- b) Auftragen des Eluats aus Schritt a) auf eine Anionenaustauscherchromatographiesäule und Eluieren eines zweiten IL-15/Fc-Eluats von der Säule; und
- c) Auftragen des Eluats aus Schritt b) auf eine Gelfiltrationssäule und Eluieren eines dritten IL-15/Fc-Eluats von der Säule.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das erfindungsgemäßen Verfahren die Herstellung eines IL-15/Fc-Fusionsproteins in einer Menge von mindestens 10 pg/(Zelle x Tag), mehr bevorzugt von mindestens 15 pg/(Zelle x Tag).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegt das Protein nach der Aufreinigung in 25 einer Reinheit von mindestens 90 %, mehr bevorzugt mindestens 95 % und am meisten bevorzugt von mindestens 99 %, vor.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist Verwendung eines/r wie oben definierten Expressionssystems, Nukleinsäure oder Wirtzelle zur Herstellung eines IL-15-Fc-30 Fusionsproteins, wobei die Verwendung wie oben beschrieben erfolgt.

Ein noch weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines CD5-Leaders, der wie oben definiert ist, zur Expression eines Proteins in CHO-Zellen und ihren Derivaten, insbesondere CHO-K1-Zellen. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung des CD5-Leaders die Expression des Proteins bzw. seine Abgabe in den Zellkulturüberstand 200- bis 300-fach gegenüber einer Expression ohne Leader erhöht ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der CD5-Leader an diesen Zellen anderen Leadern deutlich überlegen ist (siehe Beispiel 2, Fig. 8). Bei dem Protein kann es sich um ein beliebiges Protein handeln. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Expression des Proteins von einem CMV-Promotor, insbesondere in Kombination mit Intron A, reguliert wird.

10

Die folgenden Beispiele und Figuren sollen die Erfindung erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

15

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt eine Karte des Expressionskonstrukts pcDNA3.1hCD5.6Ala7.

Fig. 2 - 3 zeigt die Sequenz des Expressionskonstrukts pcDNA3.1hCD5.6Ala7 (SEQ ID NR. 1).

Fig. 4 zeigt eine Karte des Expressionskonstrukts pMG10Ala7.

20 Fig. 5 - 6 zeigt die Sequenz des Expressionskonstrukts pMG10Ala7 (SEQ ID NR. 2).

Fig. 7 A zeigt die Nukleinsäuresequenz des humanen mutierten IL-15/Fc mit CD5 Leader (SEQ ID NR. 3)

Fig. 7 B zeigt die Aminosäuresequenz des humanen mutierten IL-15/Fc mit CD5 Leader (SEQ ID NR. 4)

25 Fig. 7 C zeigt die Aminosäuresequenz des murinen mutierten IL-15/Fc mit CD5 Leader (SEQ ID NR. 5)

Fig. 8 zeigt den IL-15/Fc-Gehalt in Zellkulturüberständen von CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit dem Plasmid pcDNA3.1hCD5.6Ala7, das die jeweils angegebene Leadersequenz enthielt.

30 Fig. 9 zeigt den IL-15/Fc-Gehalt in Zellkulturüberständen von CHO-K1-Zellen nach Transfektion mit verschiedenen Expressionskonstrukten. Jeder Balken repräsentiert

den Mittelwert + SEM von Duplikatsbestimmungen von jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

pcDNA3.1 entspricht dem Vektor pcDNA3.1hCD5.6Ala7.

5 pVS8-Ala7 entspricht pSwitch-Plasmid (Valantis) mit dem Konstrukt für IL-15/Fc-Konstrukt.

pMG-Ala7 entspricht pMG-Plasmid (Invivogen) mit dem Konstrukt für IL-15/Fc-Konstrukt.

10 pCINeo-Ala7 entspricht pCI-Neo-Plasmid (Promega) mit dem Konstrukt für IL-15/Fc-Konstrukt.

BEISPIELE

Beispiel 1: Herstellung von IL-15/Fc in CHO-K1-Zellen

15 Für die Bildung einer CHO-K1-Produzentenzelllinie für IL-15/Fc sollte ein Expressionskonstrukt für IL-15/Fc gebildet und hinsichtlich seiner sekretorischen Eigenschaften, der Identität/Integrität der enthaltenen Fragmente und geeigneter Resistenzgene optimiert werden.

a) Ausgangsmaterialien

20 Ein humanes IL-15/Fc-Expressionskonstrukt (mutiertes IL-15/humanes-Fc) wurde von der Immunologieabteilung des „Beth Israel Deaconess Medical Center“ (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

25 Die Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) erhalten. Die Sequenzen für die relevanten Signalpeptide wurden aus Genbanken erhalten.

30 Die Restriktionsenzyme (BglII, XbaI, BamHI, SmaI, BstXI, ApaI), Lipfectamin2000, andere molekularbiologische Reagenzien (T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotidkinase) und die Plasmide

- pSecTagA, pcDNA3.1 wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) oder Amersham-Pharmacia (NheI, Protein A Sepharose Uppsala, Schweden) erhalten.
- Kompetente *E. coli* XL10-Gold-Zellen wurden von Strategene (La Jolla, USA) bezogen. Der BCA-Kit (Pierce) wurde von KMF Laborchemie (Sankt Augustin, Deutschland) erworben.

- Die Plasmid-DNA-Reinigungs-Kits (Endofree-Maxi-Kit, Endofree-Giga-Kit) stammten von Qiagen (Hilden, Deutschland).
- Die Antikörper wurden von BD-Pharmingen (Maus-anti-hIL-15; Katalognummer 554712; Heidelberg, Deutschland) und Dianova (Ziege-anti-Maus-POD; Katalognummer 15-036-003; Ziege-anti-human-POD; Katalognummer 109-036-088; Hamburg, Deutschland) erhalten.

b) Methoden/Ergebnisse

- Das Ausgangsplasmid enthielt in dem Vektorgerüst von pSecTagA die cDNA eines Fusionsproteins umfassend ein mutiertes human IL-15, welches an den Fc-Teil (Hinge-Region und CH2-, CH3-Region) des humanen IgG1 fusioniert war. Die Struktur des Plasmid entspricht der von Kim *et al.* beschriebenen (*J. Immunol.*, 160: 5742-5748; 1998) mit der Ausnahme, dass der Fc-Teil, welcher in dieser Veröffentlichung zitiert wird, ein murines IgY2a ist.

- Zur Sekretion des Fusionsproteins wurde der Igk-Leader, der bereits in dem pSecTagA-Vektor enthalten ist, durch Klonieren des IL-15/Fc-Teils im Leserahmen verwendet. Hierfür wurde aus der nativen IL-15-Sequenz die intrinsische Signalsequenz entfernt. Allerdings wurden aufgrund der Klonierung zwischen dem 3'-Ende der Igk-Leadersequenz und dem 5'-Ende der IL-15-kodierenden Sequenz 10 zusätzliche Aminosäuren eingeführt, die nach dem Prozessieren des Proteins beim sekretierten Protein erhalten blieben. Um diese unspezifischen Aminosäuren zu entfernen und die sekretorischen Eigenschaften des Proteins zu verbessern, wurden verschiedene Leadersequenzen anderer sekretorischer oder Zelloberflächenproteine getestet: murines Igk (Coloma *et al.*, *J. Immun. Methods* 152: 89-104; 1992; Zugangsnummer X91670), humanes CD5 (Jones *et al.*, *Nature* 323: 346-349; 1986; Zugangsnummer X04391), CD4

(Hodge *et al.*, *Hum. Immunol.* 30: 99-104; 1991; Zugangsnummer M35160), MCP-1 (Yoshimura *et al.*, *Je. FEBS Lett.* 244: 487-493; 1989; Zugangsnummer M24545) und IL-2 (Taniguchi *et al.*, *Nature* 302: 305-310; 1983; Zugangsnummer K02056) (Zugangsnummern beziehen sich auf das „National Center for Biotechnology Information“). Nach Entfernen des Igk-Leaders und der zusätzlichen Aminosäuren wurde der Leader durch die genannten Signalpeptidsequenzen durch Klonieren von doppelsträngigen Oligonukleotiden ersetzt. Die Identität wurde durch Sequenzieren überprüft. Danach wurden die resultierenden Konstrukte durch transiente Transfektion von HEK-293-Zellen unter Verwendung von Lipfectamin2000 getestet. Der Proteingehalt der Zellkulturüberstände der Zellen, die mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert wurden, wurde nach Protein-A-Sepharose-Reinigung nach dem Verfahren von Moll und Vestweber (*Methods in Molecular Biology*, 96: 77-84, 1999) mittels BCA-Test gemessen. Die Identität des Proteins wurde mittels Silberfärbung des SDS-Gels und Western-Blots gegen entweder den Fc- oder den IL-15-Teil überprüft, um die Gegenwart beider Komponenten des Fusionsproteins sicherzustellen. Der CD5-Leader ergab in den beschriebenen Experimenten die besten Ergebnisse und wurde für die weitere Vektoroptimierung ausgewählt.

Weiterhin wurde getestet, ob das Ersetzen der cDNA des Fc-Teils durch die genomische DNA, welche Exon/Intron-Strukturen enthielt, auch zu einer verbesserten Proteinexpression beiträgt. Der RNA-Export aus dem Kern und auch die RNA-Stabilität kann durch das Vorhandensein von Introns verbessert werden, die durch den Splice-Apparat des Kerns entfernt werden müssen. Daher wurde der genomische Fc-Teil an die IL-15-cDNA-Sequenz durch Insertion von Splice-Donor- und -Akzeptorstellen gebunden. Die resultierenden Plasmide wurden ebenfalls durch verschiedene Leadersequenzen modifiziert und wie oben beschrieben getestet. Die Proteinanalyse durch Western-Blot ergab allerdings, dass verschiedene unerwünschte Splice-Varianten vorhanden waren, so dass man sich entschloss, weiterhin die cDNA-Form des Fc-Teils zu verwenden.

Das resultierende Plasmid enthält folglich aus einem humanen CD5-Leader und einem cDNA-Fc-Teil.

Das Sequenzieren des mutierten IL-15/Fc-Expressionskonstrukts ergab, dass 3 Mutationen innerhalb des Fc-Teils vorhanden waren, die schon im Originalkonstrukt vorkamen. Zwei dieser Mutationen betrafen Aminosäuren an hoch konservierten Positionen. Die dritte Mutation war eine Cys-Ala-Mutation an Position 4 in der Hinge-Region, welche absichtlich eingefügt wurde, um die Bildung intra- und intermolekularer Cystein-Brücken zu unterbinden.

Um die zwei unerwünschten Mutationen unter Beibehaltung der Cys-Ala-Mutation zu entfernen, wurde die Fc-cDNA mittels RT-PCR umkloniert. Als RNA-Quelle diente eine CHO-K1-Zelllinie, die mit einem Konstrukt transfiziert war, welches für ein VCAM-1-Fc-Fusionsprotein kodiert. Das amplifizierte Fc-cDNA-Fragment wurde in das CD5-mutIL-15-Plasmid kloniert, wobei der Fc-Teil durch BamHI/XbaI-Restriktion entfernt wurde.

Das resultierende Plasmid wurde wiederum anhand distinkter Restriktionsmuster und mittels anschließenden Sequenzierens analysiert und CD5-6Ala7 genannt. Da die Verwendung von Zeocin als DNA-interkalierendes Agens Mutationen verursachen könnte, wurde die Expressionskassette für IL-15/Fc aus dem ursprünglichen pSecTagA-Gerüst entfernt und in pcDNA3.1 kloniert, welches das Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des SV40-Promotors enthält. Beide Stränge des resultierenden Plasmids wurden sequenziert und ergaben eine vollständige Übereinstimmung mit der IL-15/Fc-Expressionskassette.

Das Konstrukt wurde wiederum auf seine Proteinexpression mittels transienter Transfektion von CHO-K1-Zellen und Western-Blot-Analysen des Zellkulturüberstands getestet. Als positive Kontrolle wurde parallel hierzu eine Transfektion mit dem Plasmid CD5-6Ala7 durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung in Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen in Triplikaten ausgesät. Zur Transfektion wurden 2 µg Plasmid und 4 µl Lipofectamin2000, welche jeweils in 250 µl Optimem1-Medium verdünnt wurden, verwendet. Beide Lösungen wurden gemischt und nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch in die Kulturmedien der Gewebekulturplatten pipettiert.

2 Tage nach der Transfektion wurde das Kulturmedium entfernt und auf seinen IL-15/Fc-Gehalt durch einen Western-Blot gegen den humanen IL-15-Teil analysiert: 20 µl des Zellkulturüberstands wurden mit 5 µl 5 x Laemmli-Puffer gemischt und bei 85°C für 5 min inkubiert. Dann wurden die Proben über ein 12% Polyacrylamidgel laufen gelassen. Danach wurde das Gel unter Verwendung einer halbtrockenen Blotkammer geblottet. Der Blot wurde über Nacht mit Blockerlösung enthaltend 5% Milchpulver in PBS, 0,1% Tween20 behandelt. Danach wurde der Blot für 4 Stunden mit einem monoklonalen Maus-anti-humanes-IL-15-Antikörper in einer 1:1000-Verdünnung in Blockerlösung inkubiert. Nach 3 Waschschritten (10 min PBS, 0,1% Tween20) wurde der Blot mit dem Zweitantikörper Ziege-gegen-Maus-Peroxidase (Verdünnung 1:5000) für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde wiederum 3 Mal gewaschen und danach Lumilicht-Lösung auf die Oberfläche des Blots getropft und ein Röntgenfilm wurde dem Blot ausgesetzt.

15 Spezifische Western-Blot-Signale im Bereich der Signale, die nach Transfektion mit CD5-6Ala7 erhalten wurden, ergaben, dass die Zellkulturüberstände aller 3 Paralleltransfektionen IL-15/Fc als Protein enthielten. Es konnte daher gezeigt werden, dass das Plasmid pcDNA3.1hCD5.6Ala7 (Fig. 1 bis 3) zur Proteinexpression in CHO-K1-Zellen verwendet werden kann.

20

c) Schlussfolgerungen

Ein IL-15/Fc-Plasmid pcDNA3.1hCD5.6Ala7 wurde hergestellt, welches eine Expressionskassette enthielt, die einen CD5-Leader mit einem mutierten humanen IL-15, welches an die cDNA von humanem IgG1-Fc unter der Kontrolle des CMV-Promotors fusioniert war, enthielt. Zur Selektion von stabilen eukaryotischen Zellklonen wurde ein Neomycin-Resistenzgen eingeführt. Das Plasmid wurde sequenziert und ergab eine 100%-ige Übereinstimmung in den relevanten kodierenden Bereichen mit nur einer geringen Diskrepanz (Wiederholung von 3 Basenpaaren) ohne irgendeine Relevanz in dem Vektorgerüst. Die 30 Funktionalität des Konstrukts wurde durch transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen überprüft.

BEISPIEL 2

Die Transfektion eukaryotischer Zelllinien (z.B. CHO-K1-Zellen) mit einem Plasmid, das die 5 DNA für das gewünschte Produkt enthält, ist ein Standardverfahren zur Produktion therapeutischer Proteine. Dennoch sind die niedrigen Produktivitätsspiegel der so hergestellten stabilen Zellklone ein gemeinhin bekanntes Problem. Daher gibt es verschiedene Strategien zur Erhöhung der Produktivität einer bestehenden Zelllinie. Abgesehen von dem Versuch, die Zahl 10 der Plasmidkopien in der Zelle zu erhöhen (z.B. durch das Methotrexat/DHFR-System), besteht weiterhin die Möglichkeit, das Expressionskonstrukt selbst zu modifizieren. Zusätzlich zu einem starken Promotor (z.B. dem CMV-Promotor) führt das Einführen eines Introns möglicherweise zu einer besseren RNA-Stabilität und einem besseren Export der RNA aus dem Kern, welcher von dem Splice-Apparat der Zelle durchgeführt wird. Dennoch muss getestet werden, welche Kombination von Intron/Transgen geeignet ist. Hierfür wurden verschiedene 15 Introns mit dem humanen IL-15-Fc kombiniert, um eine Kombination zu finden, die die IL-15-Fc-Produktion von CHO-K1-Zellen erhöht.

a) Materialien

20 Als Plasmid wurde das Plasmid pcDNA3.1hCD5.6Ala7 als Ausgangsplasmid verwendet. Es ist schematisch in Figur 1 dargestellt. Seine Sequenz ist als SEQ ID NR. 1 offenbart.

Als Testsystem wurden sowohl CHO-K1-Zellen (DSM, Braunschweig, Deutschland, Zugangsnummer: ACC110) als auch HEK-293-Zellen (Qbiogene, Grünberg, Deutschland, 25 AE80503, QBI-293A) verwendet. Weiterhin wurden *E. coli*-Zellen (XL10-Gold, Strategene, La Jolla, USA) eingesetzt. Die Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen (5% CO₂, 37°C, Feuchtklima) kultiviert. Die CHO-K1-Zellen wurden zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:20 und die HEK-293-Zellen im Verhältnis 1:6 passagiert. Als Medium wurden für die CHO-K1-Zellen DMEM-F12+10% FKS+1% PEN/Strep und für die HEK-293-Zellen 30 DMEM+Glutamax+10% FKS+1% PEN/Strep eingesetzt. Zur Transfektion wurde Optimem1-Medium verwendet. Alle Medien wurden von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

(Katalognummern 31331-028; 32430-027; 51985-018) eingesetzt. Als Plasmid wurde ein pCI-Neo (Promega) mit einem CMV-Promotor und einem chimären Intron, einer 5'-Splice-Donorstelle des humanen beta-Globin-Gens sowie einer 3'-Splice-Akzeptorstelle der IgG schweren Kette der variablen Region eingesetzt. pMG (Invivogen) ist ein prolongierter CMV-Promotor mit einem IntronA aus CMV. pSwitch (Valantis) ist ein synthetisches Intron IVS8. Weiterhin wurden die folgenden Enzyme bzw. Restriktionsenzyme verwendet: ApaI, EcoRV, XbaI, NruI, PacI, SmaI, XhoI, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, alkaline Phosphatase aus Kälberinnereien. Diese und andere molekularbiologische Reagenzien (Lipofectamin2000) wurden von Invitrogen erhalten. NheI wurden von Amersham-Pharmacia (Uppsala, Schweden) und die Plasmidreinigungs-Kits von Qiagen, Hilden, Deutschland, erhalten. Das „Expand High Fidelity PCR-System“ (Katalognummer 1 732 641) wurde von Roche, Mannheim, Deutschland, erhalten.

b) Methoden

15

- i) Das IL-15/Fc-Insert aus dem Plasmid pcDNA3.1hCD5.6Ala7 wurde durch NheI/ApaI-Verdau isoliert. Zuerst wurde das Plasmid durch eine ApaI-Restriktion linearisiert und die 5'-Überhänge durch T4-Polymerasebehandlung stumpfendig gemacht. Danach wurde das IL-15/Fc-Insert durch einen anschließenden NheI-Verdau isoliert. Das Fragment wurde mit pCI Neo, welches mit NheI und SmaI verdaut worden war, ligiert.
- ii) Der CMV-Promotor von pcDNA3.1hCD5.6Ala7 wurde entfernt und durch den verlängerten CMV-Promotor mit Intron A, welcher aus pMG stammte, ersetzt: Das pMG-Plasmid wurde mit PacI geschnitten und die Überhänge mittels T4-Polymerasebehandlung stumpfendig gemacht. Nach einer zweiten XbaI-Behandlung wurde das so erhaltene 1,7 kb Fragment, welches den CMV-Promotor + Intron A enthielt, durch Agarosegelektrophorese gereinigt. Mittels NheI- und anschließendem NruI-Restriktionsverdau wurde der CMV-Promotor aus pcDNA3.hCD5.6Ala7 entfernt. Das resultierende Fragment wurde bei 4°C über Nacht mit dem pMG-Promotor-Intron ligiert.

iii) Das Intron IVS8 wurde mittels PCR amplifiziert und zwischen das 3'-Ende des CMV-Promotors und das 5'-Ende des IL-15-Inserts in pcDNA3.1hCD5.6Ala7 kloniert. Das Plasmid wurde mittels NheI-Restriktionsverdau linearisiert und anschließend mit alkaliner Phosphatase aus Kälbereingeweiden behandelt. Das Intron wurde durch PCR mit Primern, die XbaI-Restriktionsschnittstellen enthielten, unter Verwendung des „Expand High Fidelity PCR-Systems“ unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: Als Reaktionsgemisch wurden 2 µl dNTPs (Qiagen, Taq core kit, 2 mmol/l jedes), 25 pmol Primer, 5 µl 10 x Puffer, 0,75 µl High Fidelity Taq Polymerase, 1 µl (ungefähr 15 ng) pSwitch-XhoI/EcoRV-Fragment ad 50 µl Wasser verwendet. Das PCR-Programm (25 Zyklen) war wie folgt: 5 min 95°C, 15 sec 94°C, 30 sec 55°C, 30 sec 72°C, 5 min 72°C. Das PCR-Produkt wurde mit XbaI geschnitten, aus einem 0,8% Agarosegel eluiert und mit dem linearisierten Plasmid ligiert.

Die resultierenden Plasmide wurden in *E. coli* XL10 Gold transformiert und die Plasmide mittels Miniprep analysiert. Ein Klon eines jeden Plasmids, welches ein geeignetes Restriktionsmuster zeigte, wurde für die anschließende Endotoxin-freie Plasmidpräparation verwendet.

Die IL-15/Fc-Expression wurde nach transienter Transfektion von HEK-293- oder CHO-K1-Zellen analysiert. Einen Tag vor Durchführung der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen in Duplikaten ausgesät. Zur Transfektion entsprechend Felgner et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417; 1987) wurden 2 µg Plasmid und 4 µl Lipofectamin2000 jeweils in 250 µl Optimem1-Medium verdünnt. Beide Lösungen wurden gemischt und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch in das Zellkulturmedium in den Zellkulturplatten pipettiert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Kulturmumedium entfernt und auf den IL-15/Fc-Gehalt durch einen gegen den Fc-Teil von IL-15/Fc gerichteten ELISA-Test bestimmt.

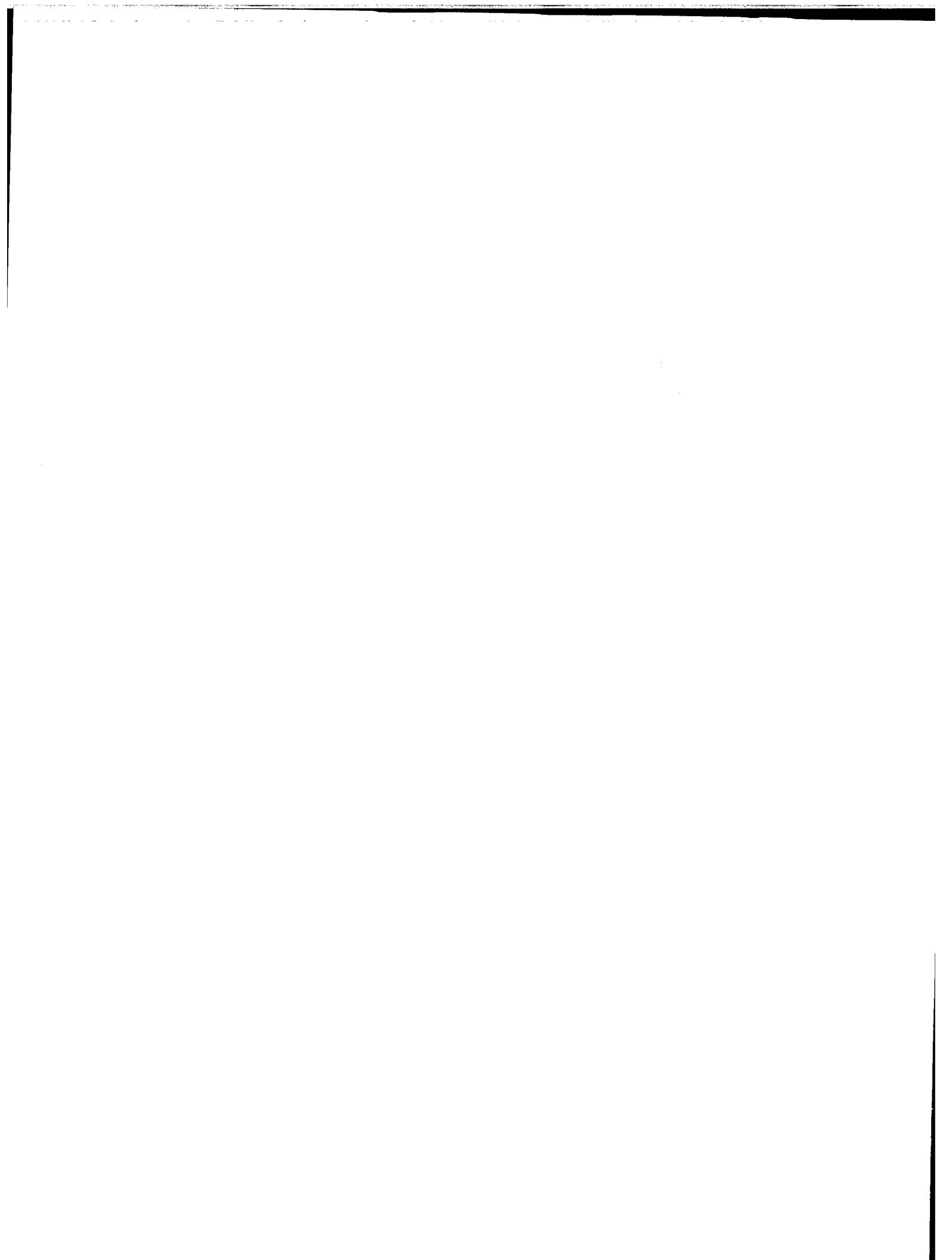
c) Ergebnisse

- Die IL-15/Fc-Sekretion von HEK-293-Zellen, die mit verschiedenen Expressionskonstrukten transfiziert waren, wurden durch andere Vektorkomponenten kaum beeinflusst. Im Gegensatz dazu war die IL-15/Fc-Expression von CHO-K1-Zellen um den Faktor 200-300 nach der Insertion eines Introns in das IL-15/Fc-Konstrukt erhöht. Das Originalkonstrukt pcDNA3.1hCD5.6Ala7 führte zu Proteinsekretionsspiegeln, die kaum nachweisbar waren (unter 10 ng/ml), wobei die Insertion eines Introns zu IL-15/Fc-Spiegeln von ungefähr 300 ng/ml nach Transfektion der Zellen mit pMG10Ala7 (Fig. 4 bis 6; SEQ ID NR. 2) führte. Die ELISA-Daten, die die IL-15/Fc-Expressionsspiegel in CHO-K1-Zellen zeigen, sind in Figur 4 dargestellt. Da die Expressionsspiegel nach Transfektion mit dem pMG-Konstrukt am höchsten waren, wurde dies für die Bildung einer stabilen CHO-K1-Expressionszelllinie ausgewählt.
- Hierzu wurde das Plasmid zunächst einer Einzelstrangsequenzierung unterzogen. Beide Stränge des Konstrukts wurden in dem Bereich, der die IL-15/Fc-Kassette, den neu insertierten CMV-Promotor und das Intronfragment enthielt, sequenziert. Das Plasmid enthält die IL-15/Fc-Kassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Zwischen dem Promotor und dem Translationsstart wurde das Intron A, welches aus CMV (Plasmid MG) stammte, positioniert. Das Plasmid enthält stromabwärts des IL-15/Fc-Fragments eine BGHPolyA-Stelle; das Neomycin-Resistenzgen wurde von einem SV40-Promotor gesteuert und enthält auch eine SV40polyA-Stelle. Zur Selektion und Amplifikation in *E. coli* enthält das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen.

d) Diskussion und Schlussfolgerungen

Um den Proteinertrag der stabilen CHO-K1-IL-15/Fc-Transfektanten zu erhöhen, wurde das Expressionsplasmid durch Einführen eines Introns zwischen dem Promotor und der IL-15/Fc-Kassette modifiziert. Die Kombination Intron-Transgen-Wirtszelle hat einen großen Einfluss auf die Proteinexpression, weshalb es nicht vorhersagbar ist, welches Intron am wirksamsten in der Steigerung der IL-15/Fc-Expression in den beiden analysierten Zelltypen ist.

Während HEK-293-Zellen von der Einführung des Introns kaum beeinflusst wurden, wurde in CHO-K1-Zellen eine große Erhöhung der IL-15/Fc-Sekretion nachgewiesen. Die Expression des IL-15/Fc-Proteins in CHO-K1-Zellen wurde über weit mehr als eine Größenordnung im Vergleich zum ursprünglichen IL-15/Fc-Expressionsvektor erhöht, wobei ein Plasmid verwendet wurde, das den CMV-Promotor und Intron A aus pMG enthielt. Das Plasmid kann zur Herstellung einer IL-15/Fc-Produzentenzelllinie verwendet werden, die zur Herstellung von IL-15/Fc für vorklinische und klinische Studien oder auch zur industriellen Produktion von IL-15/Fc eingesetzt werden kann.



14. April 2004

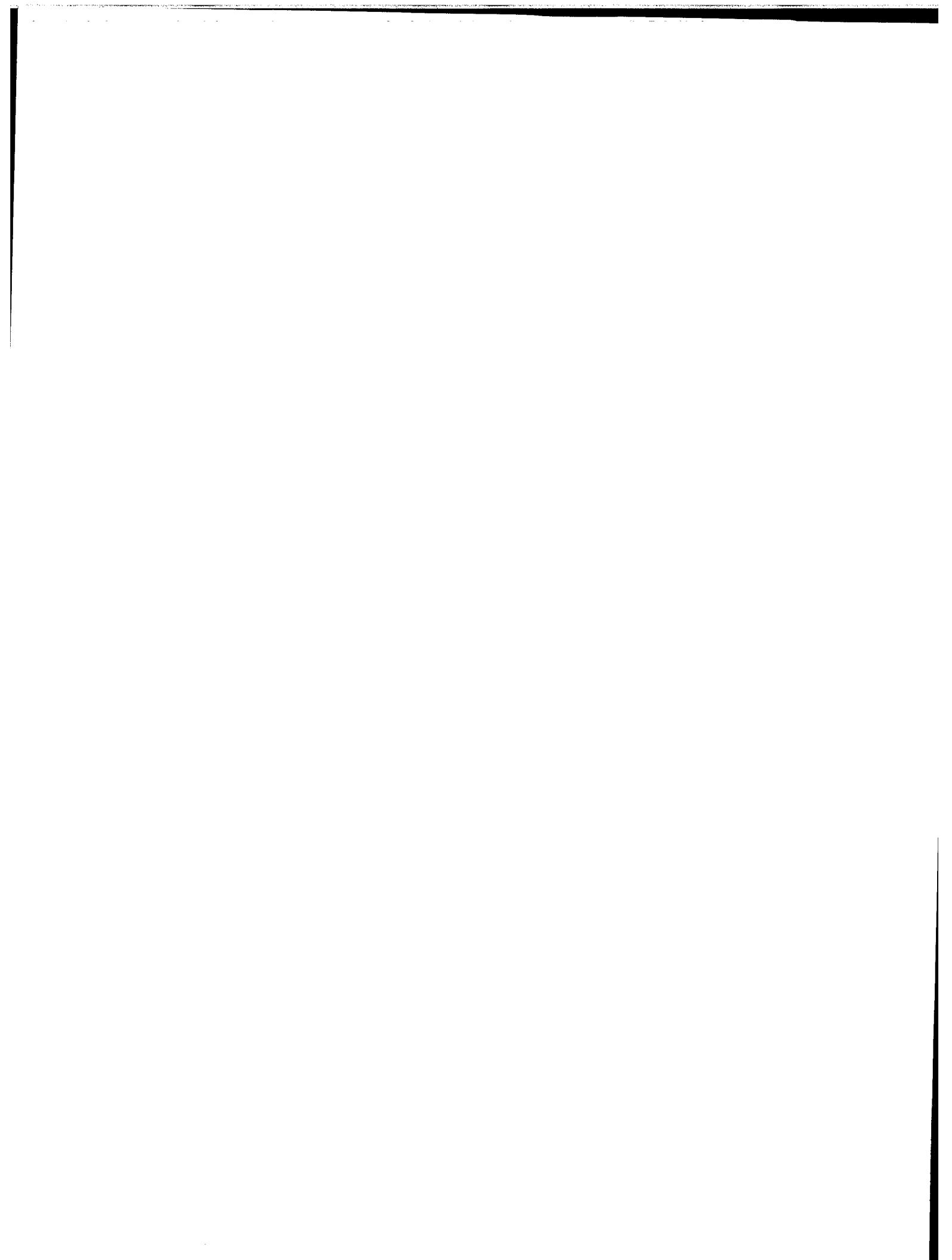
F. Hoffmann-La Roche AG

14. April 2004
C62387EP BÖ/FLZ/ATE**Patentansprüche**

1. Expressionssystem enthaltend eine oder mehrere Nukleinsäure(n) umfassend
 - 5 a) mindestens eine Nukleinsäure für ein IL-15/Fc-Fusionsprotein,
 - b) mindestens einen Promotor und
 - c) mindestens eine Nukleinsäure für einen CD5-Leader,
wobei der Promotor und die Nukleinsäure für den CD5-Leader funktionsfähig mit
der Nukleinsäure für das IL-15/Fc-Fusionsprotein verknüpft sind.
- 10 2. Expressionssystem nach Anspruch 1, wobei der Promotor ein CMV-Promotor ist.
3. Expressionssystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Promotor Bestandteil einer
transkriptionsregulierenden Einheit ist, die zusätzlich ein Intron, insbesondere
15 Intron A, enthält.
4. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich bei dem Fc-
Teil des Fusionsproteins um ein Fc-Fragment eines Immunglobulins G handelt.
- 20 5. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthaltend zusätzlich
d) mindestens eine Nukleinsäure für ein selektionierbares Markergen.
6. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthaltend zusätzlich
mindestens eine Nukleinsäure für ein Polyadenylierungssignal.
- 25 7. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthaltend zusätzlich
Ribosomen, Aminosäuren und/oder t-RNAs.
8. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Expressions-
30 system nur eine Nukleinsäure umfasst.

9. Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8 enthaltend eine Nukleinsäure mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2 oder SEQ ID Nr. 3 oder eine Nukleinsäure, die für ein Polypeptid der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert.
10. Nukleinsäure enthaltend die Bestandteile a) bis c) der Ansprüche 1 bis 4 und optional Bestandteil d) aus Anspruch 5.
11. Nukleinsäure enthaltend die Sequenz von SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2 oder 3 oder eine Nukleinsäure, die für ein Polypeptid der SEQ ID NR. 4 oder SEQ ID NR. 5 kodiert.
12. Wirtszelle enthaltend ein Expressionssystem gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 oder eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 oder 11.
13. Wirtszelle nach Anspruch 12, wobei es sich um eine Säugerzelle handelt.
14. Wirtszelle nach Anspruch 12 oder 13, wobei es sich um eine Zelle der Zelllinie CHO oder deren Derivate, insbesondere eine CHO-K1-Zelllinie, handelt.
15. Verfahren zur Herstellung eines IL-15/Fc-Fusionsproteins umfassend
 - a. Bereitstellen einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 12 bis 14,
 - b. Kultivieren der Wirtszelle,
 - c. gegebenenfalls Selektionieren und
 - d. Isolieren des exprimierten IL-15/Fc-Fusionsproteins.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei es sich bei der Wirtszelle um eine Säugerzelle, vorzugsweise um eine Zelle der Zelllinie CHO oder deren Derivate, besonders bevorzugt um eine CHO-K1-Zelllinie, handelt.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, wobei das IL-15/Fc-Fusionsprotein in einer Menge von mindestens 10 pg/(Zelle x Tag), vorzugsweise in einer Menge mindestens 15 pg/(Zelle x Tag), hergestellt wird.
- 5 18. Verwendung eines Expressionssystems nach einem der Ansprüche 1 bis 9, einer Nukleinsäure nach Anspruch 10 oder 11 oder einer Wirtzelle nach einem der Ansprüche 12 bis 14 zur Herstellung eines IL-15-Fc-Fusionsproteins.
- 10 19. Verwendung eines CD5-Leaders zur Expression eines Proteins in CHO-Zellen und ihren Derivaten, insbesondere CHO-K1-Zellen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Expression des Proteins von einem CMV-Promotor, insbesondere in Kombination mit Intron A, reguliert wird.



14. April 2004

14. April 2004
C62387EP BÖ/ATE/smi

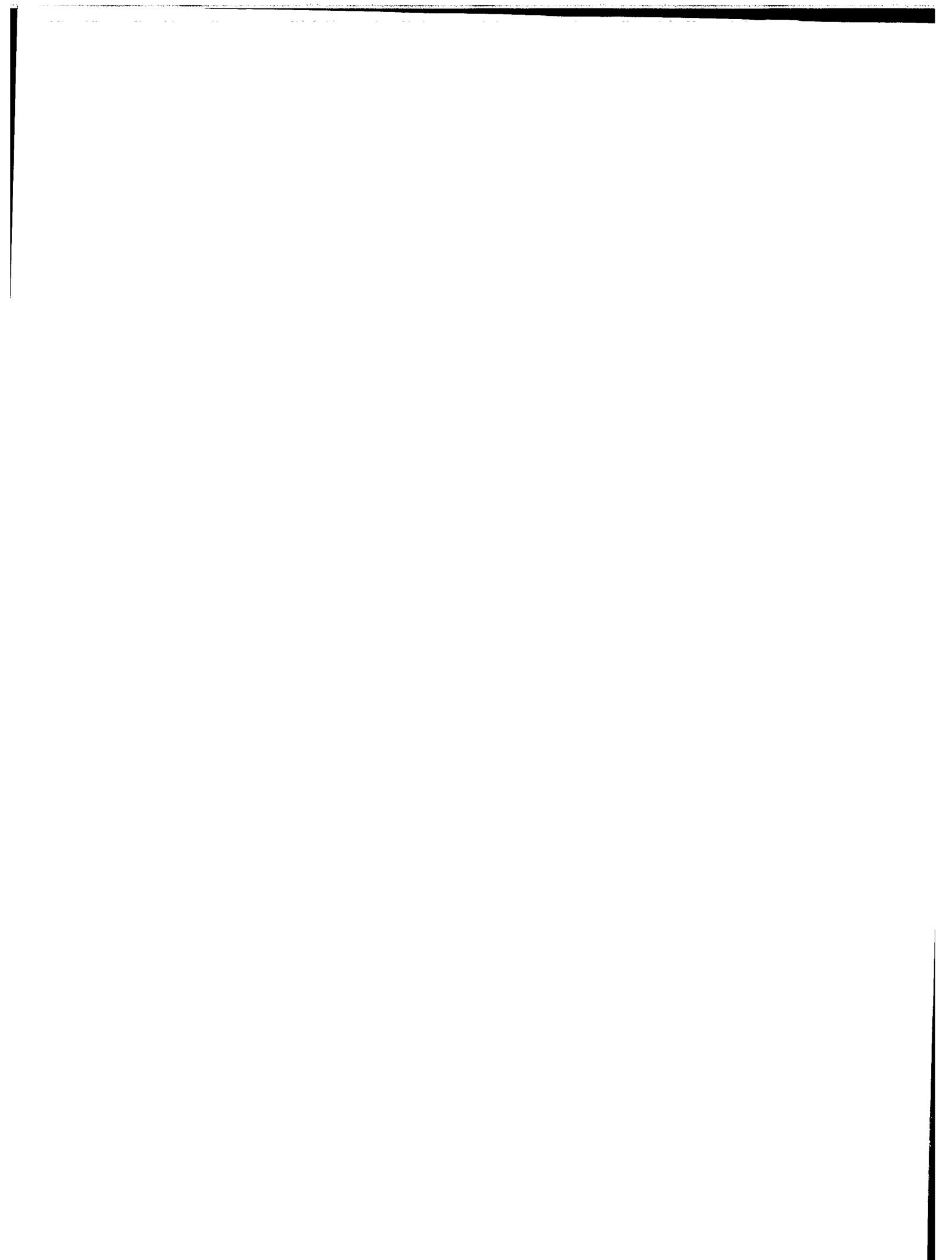
F. Hoffmann-La Roche AG

1

Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem enthaltend eine oder mehrere Nukleinsäure(n) umfassend mindestens eine Nukleinsäure für ein Interleukin 15/Fc- (IL-15/Fc) -Fusionsprotein, mindestens einen Promotor, mindestens eine Nukleinsäure für einen CD5-Leader und ggf. mindestens eine Nukleinsäure für ein selektionierbares Markergen; eine Nukleinsäure umfassend die Bestandteile des genannten Expressionssystems sowie eine Wirtszelle enthaltend das Expressionssystem oder die Nukleinsäure. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines IL-15/Fc-Fusionsproteins unter Verwendung des Expressionssystems sowie die Verwendung des Expressionssystems, der Nukleinsäure, der Wirtszelle oder des CD5-Leaders zur Expression in Wirtszellen.

15



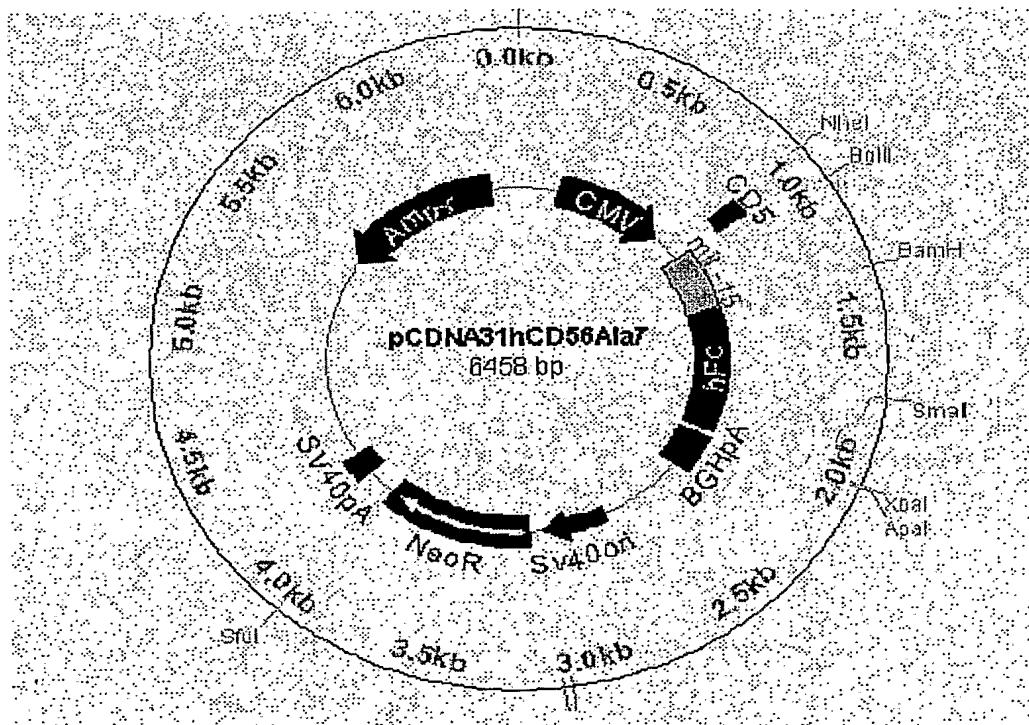


Fig. 1

gacggatcg	gagatctccc	gatccccat	ggtgactt	cagtacaatc	tgctctgat	60
ccgcatagtt	aaggcaagt	atctgtccct	tttgtgtt	ggaggtcgt	gagtagtgcg	120
cgagcaaaat	ttaagctaca	acaaggcaag	gttgcacga	caattgcat	agaatctgc	180
ttagggttag	gcgtttcg	ctgttcgc	atgtacggc	cagatatacg	cgttgacatt	240
gattattgac	tagttatcaa	tagaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agccatata	300
tggagttcc	cgttacataa	cttacggtaa	atggccgccc	tggctgacc	cccaacgacc	360
cccgccccatt	gacgtcataa	atgacgtat	ttcccatat	aacgccaata	gggactttcc	420
attgacgtca	atgggtggag	tatttacgt	aaactgccc	cttggcag	catcaagtgt	480
atcatatgcc	aagtacgccc	cctattgacg	tcaatgcac	taatatggcc	gcctggcatt	540
atgcccagta	catgaccta	tggacttcc	ctacttggc	gtacatctac	gtttagtca	600
tcgcttattac	catggtgat	cgggtttggc	agtacatcaa	tgggcgtg	tagcgggtt	660
actcacgggg	atttccaaat	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagttt	tttggcacc	720
aaaatcaaac	ggacttccca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccatggacg	caaattggcg	780
gtaggcgtag	acgggtggag	gtotatataa	gcagagctt	ctggctacta	agagaaccca	840
ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggcttagc	900
caccatgccc	atggggtctc	tgcacccgt	ggccacctt	tacctgtt	gatgtctgg	960
cggttccctc	ctcggaaact	gggtgaatgt	aataagtat	ttgaaaaaaa	ttgaagatct	1020
tattcaatct	atgcatttt	atgtacttt	atatacgaa	agtgtatgtt	accccgatgt	1080
caaaggtaaca	gcaatgaagt	gctttcttct	ggagttacaa	gttatttac	ttgagttccgg	1140
agatgcaagt	attatcgata	cagtagaaaa	tctgtatcat	ctagcaaaca	acagtttgc	1200
ttctaattggg	aatgtacacag	aatctggat	aaaaaaatgt	gaggaacttg	aggaaaaaaa	1260
tattaaagaa	tttttgaca	gttttgcata	tattgtcgac	atgttcatca	acacttccga	1320
tcccaaattct	gtcgacaaaa	ctcacatcg	cccaccgtgc	ccagcac	aaacttctgg	1380
gggaccgtca	gttccctct	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	1440
ccctggggtc	acgtgcgtt	tgggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	1500
ctggtaacgt	gacggcgtt	agggtgcata	tgccaagaca	aagccgggg	aggagcagta	1560
caacagcacc	taccgtgtt	tcagcgttct	caccgttctg	caccaggact	ggctgaatgg	1620
caaggagtac	aagtgcacgg	tctccaaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	1680
ctccaaagcc	aaaggcacc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctggccc	catcccgga	1740
tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcgtac	ctgcctggc	aaaggcttct	atcccagcga	1800
catcgccgt	gagtggaga	gcaatgggca	gccccgagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	1860
cgtgtggac	tccgacggc	cctttttctt	ctacagcag	ctcaccgtt	acaagagcag	1920
gtggcagcag	gggaacgtt	tctatgtctc	ctgtgtatgc	gaggctctgc	acaaccacta	1980
cacgcagaag	agccctctcc	tgttccggg	taaatatgt	agagggcccg	ttaaaccctg	2040
ctgtatcagcc	tcgactgtgc	cttctatgtt	ccagccatct	gttggtttgc	ccttccccgt	2100
gccttccttgc	accctggaa	gtgcacttcc	cactgttctt	tcctataaaa	atgaggaaat	2160
tgcatcgcat	tgtctgat	gggtgttattc	tattctgggg	ggtgggggtt	ggcaggacag	2220
caaggggggag	gattggggag	acaatagcag	gcatgttgg	gatgcgttgg	gctctatggc	2280
ttcttggggcg	gaaagaaacca	gtctgggttac	tagggggat	ccccacgcgc	cctgtatgcgg	2340
cgccattaago	gccccgggtt	tgggttttac	gcccggcgtt	accgttacac	ttgcggcggc	2400
ccttagcgc	gttccttgc	ttttttttcc	ttcccttctc	gccacgttgc	ccggctttcc	2460
ccgtcaagct	ctaaatcggt	ggctccctt	agggttccga	tttagtgc	tacggcacct	2520
cgaccccaaa	aaacttgcatt	gggttttttt	agggttccga	ggccatcg	cctgtatagac	2580
gttttttgc	cttttgcgt	ttttttttcc	ttttttttcc	ggccatcg	cctgtatagac	2640
tggaaacaaca	ctcaaccctt	tctcggttca	ttttttttcc	ttttttttcc	ttttttttcc	2700
ttcggccctat	tggttaaaaa	atgagatgt	ttaacaaaaa	tttaacgcga	attaattctg	2760
tggaaatgtgt	gtcagttag	gtgtggaaag	tcccccaggct	ccccaggcagg	cagaagtatg	2820
caaaggatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	agttcccaagg	ctccccagca	2880
ggcagaagta	tgcaaaagat	gcatctcaat	tagtcagcaa	ccatagtccc	gcccccaact	2940
ccggccatcc	cgccccatcc	tccggccatgt	ttccggccatt	ctccggccca	tggctgacta	3000
attttttttta	tttatgcata	ggccggaggcc	gcctctgc	ctgactt	ccagaaggtag	3060
tgaggaggct	tttttggagg	ccttagtctt	tgccaaaaagc	tcccccggac	ttgtatatcc	3120
attttcggat	ctgtatcaaga	gacaggatga	ggatgtttc	gcatgtatga	acaagatgg	3180
ttgcacgcac	gttctccggc	cgcttgggt	gagaggctat	tcggctatga	ctgggcacaa	3240
cagacaatcg	gtctgtctga	tgccggcgtt	ttccggctgt	cagcgcagg	ggccgggtt	3300
ctttttgtca	agaccggact	gtccgggtcc	ctgtatcgat	tcgaggacga	ggcagcgcgg	3360
ctatcggtcc	tggccacgc	ggccgttcc	tgccgcgtt	tgctgcacgt	tgtctatgg	3420
gcggggagg	actggctgt	attggcgaa	gtgcggggc	aggatctt	gtcatctcac	3480
cttgccttgc	ccgagaaatgt	atccatcat	gtgtatgc	tgccgggtt	gtatacgctt	3540
gatccggcta	cctgcccatt	cgaccaccaa	gcaaaacatc	gcatcgacg	agcaegact	3600
cgatggaaag	ccggcttctt	cgatcaggat	gatctggacg	aagagcatca	ggggctcgcg	3660
ccagccgaac	tgttcggccag	gctcaaggcg	cgcatgccc	acggcgagg	tctgtatgc	3720
accatggcg	atgcctgttt	gccgaatatac	atgggtggaaa	atggccgtt	ttctggattc	3780

Fig. 2

atcgactgtg	gccggctggg	tgtggcggac	cgctatcagg	acatagcgtt	ggctaccgcgt	3840
gatattgtcg	aagagcttgg	ccggaaatgg	gctgaccgct	tcctcgtgt	ttacggatc	3900
gcccgtcccc	attcgcagcg	catcgcccttc	tatcgcccttc	ttgacgagtt	cttctgagcg	3960
ggactctggg	gttcgaaatg	accgaccaag	cgacgccccaa	cctgcccata	cgagatttcg	4020
attccacccgc	cgcccttctat	gaaaggttgg	gcttcggaaat	cttttccgg	gacgcoggct	4080
ggatgatcct	ccagcgcggg	gatctcatgc	tggagttctt	cgcccacccc	aacttgttta	4140
ttgcagctta	aatatggttac	aaataaaagca	atagcatcac	aaattttcaca	aataaaagcat	4200
tttttcaact	gcaattcttagt	tgtggtttgt	ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtct	4260
gtataccgtc	gacctctagc	tagagcttgg	cgtaatcatg	gtcatagctg	tttcctgtgt	4320
gaaattgtta	tccgctcaca	atccacacac	acatacgagc	cggaagcata	aagtgtaaag	4380
cctgggtgc	ctaattgagtg	agctaactca	cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgcctt	4440
tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	oggccaacgc	gcggggagag	4500
gcccctttgcg	tattgggcgc	tcttcogctt	cctcgctcac	tgactcgcgt	cgctcggtcg	4560
ttcggctgcg	gcccggcggt	tcagctca	caaaggcggt	aatacgggtt	tccacagaat	4620
caggggataa	cgccggaaag	aacatgttag	caaaaaggcca	gaaaaaggcc	aggaaccgta	4680
aaaaggccgc	gttgcggcg	tttttccata	ggctccggcc	ccctgccgg	catcacaaaa	4740
atcgacgctc	aagtcaagg	ttggcgaaacc	cgacaggact	ataaaagatac	caggcggttc	4800
cccccttggaa	ctccctcg	cgctctcctg	ttccgaccc	gcegettacc	ggataacctgt	4860
ccgcctttct	cccttcggg	agcgtggcgc	tttctcatag	ctcacgcgt	aggtatctca	4920
gttcgggtgt	ggtcgttcgc	tccaaagctgg	gctgtgtgca	cgaaacccccc	gttcagcccc	4980
acccgtgcgc	cttatccgg	aactatgc	tttagtccaa	ccccgttaga	cacgacttat	5040
cgccacttgc	agcagccact	ggtaacagga	tttagcagagc	gaggatgtt	ggcggtgtca	5100
cagagttctt	gaagtgggtgg	cctaactacg	gctacactag	aagaacagta	tttggtatct	5160
gcccgtctgt	gaagccagg	accttcggaa	aaagagttgg	tagcttttg	tccggcaaac	5220
aaaccaccgc	ttgttagcggt	ggtttttttg	tttgcagca	gcagattacg	cgccggaaaaaa	5280
aaggatctca	agaagatctt	ttgatctttt	ctacggggc	tgacgctcag	tggaaacgaa	5340
actcacgtt	agggattttt	gtcatgagat	tatccaaaag	gatcttcacc	tagatctttt	5400
taaaataaaa	atgaagtttt	aatcaatct	aaatataat	ttagttaact	ttgtctgaca	5460
gttaccaatg	cttaatcagt	gagggaccta	tctcagcgat	ctgtcttattt	cgttcatcca	5520
tagtgcctg	actcccccgtc	gttgcgat	ctacgatacg	ggagggctt	ccatctggcc	5580
ccagtgctgc	aatgataccg	cgagaccac	gctcaccggc	tccagattt	tccagatata	5640
accagccagc	cggaagggcc	gagcgcagaa	gtggctctgc	aacttatacc	gcctccatcc	5700
agtctattaa	ttgttgcgg	gaagcttag	taatgttgc	gcccgtttaat	agtttgcgc	5760
acgttgc	cattgtaca	ggcatacg	tgtcacgtc	gtcggttgg	atggcttcat	5820
tcagtcgg	tttcccaacga	tcaaggccgg	ttacatgatc	ccccatgtt	tgccaaaaaa	5880
cggtagctc	tttcggctct	ccgatgttgc	tcagaagtt	gttggccgca	gtgttatcac	5940
tcatgttat	ggcagcactg	cataatttc	ttactgtat	gcccattccgt	agatgtttt	6000
ctgtgactgg	tgagtagtca	accaagtcat	tctgagaata	gtgtatgcgg	cgaccggagtt	6060
gctttggccc	ggcgtcaata	cgggataata	ccggccacata	tagcagaact	ttaaaagtgc	6120
tcatcattgg	aaaacgttct	tcggggcgaa	aactctcaag	gatcttaccg	ctgttgagat	6180
ccagttcgat	gtAACCCACT	cgtgcaccca	actgatcttc	agcatcttt	actttccacca	6240
gogtttctgg	gtgagcaaa	acaggaaggc	aaaatggcc	aaaaaaggga	ataagggcga	6300
cacgaaatg	ttgaataactc	atactttcc	ttttcaata	ttattgttgc	atttatcagg	6360
gttattgtct	catgagcgga	tacatattt	aatgtat	aaaaataaa	caaataagggg	6420
ttccgcgcac	atttccccga	aaagtccac	ctgacgtc			6458

Fig. 3

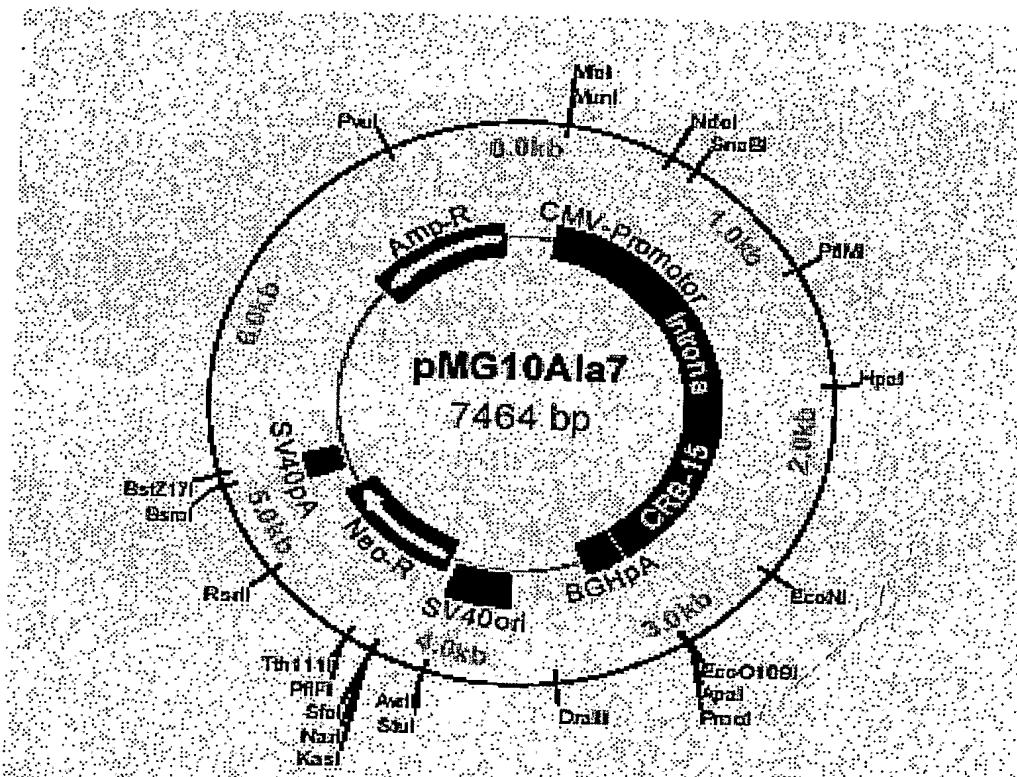


Fig. 4

gacggatcg	gagatctccc	gatcccttat	ggtgcaactc	cagtacaatc	tgctctgat	60
ccgcata	ttaa	ggctccctg	cttgggtgtt	ggaggtcgc	gagtagtgc	120
cgagcaaaat	ttaa	ggcttgc	atgggcatt	aacaatcatt	attttcat	180
ttagggtta	ggcttgc	atgggcatt	gggggggg	gaggccagaa	tgactccaag	240
gatctgtgt	ttgggtttt	gtgtgggtt	gggggggg	gaggccagaa	tgactccaag	300
agotacagga	aggcagg	gagacccac	tggacaaaca	gtggctggac	tctgcaccat	360
aacacacaat	caacagg	gtgagctgg	tcgagctaga	gtccgttaca	taacttacgg	420
taaatggccc	gcctggctg	ccggccaa	acccccc	attgacgtca	ataatgacgt	480
atgttccat	agtaacgc	atagg	tccat	tcgacgtca	ttatggact	540
ggtaaactgc	ccacttggc	gtacatca	tgtatcat	gccaagta	ccccctatt	600
acgtcaatg	cggttaatgg	cccgccctgg	attatgccc	gtacatgacc	ttatggact	660
ttccctactt	gcagtacatc	tacgtatt	tcatcgctat	taccatgg	atgcgggtt	720
ggcagta	caatgg	ggatagcgg	ttgactcac	gggat	ctccacc	780
ccattgacgt	caatgg	ttgttttgg	accaaaatc	acgggact	ccaaaatgtc	840
gtaacaactc	cgccccatt	acgcaa	atgg	gggttaggg	tgtacgttgg	900
taagcagagc	tcgtttag	aaccgtc	tcgcctgg	acgcattc	cgtgtttt	960
acctccatag	aagacacc	gaccatc	gcctccg	ccgggaa	tgcat	1020
cgcgattcc	ccgtgcca	agtga	gtaccgc	tagat	tctat	1080
ccttggctt	ttatgc	tatact	ttggctt	gtctat	ccccgtt	1140
tcatgttata	ggtgatgg	tagctt	tatagg	gttatt	tgac	1200
cactccctt	ttggtgac	tactt	tactat	taacat	ggccaca	1260
actcttctt	ttggctat	gccaat	tgtcctt	agact	gacac	1320
tttttac	atgggtct	atttatt	tacaa	cata	acaccgt	1380
ccagtgc	cagttttt	taaacata	gtgggat	cacgc	tcgggtac	1440
gttccggaca	ttggctt	tccgg	gcggag	tacat	ccctgtt	1500
atgcctcc	cgactcat	tcgct	gctctt	ccta	acgtg	1560
ttaggc	cacgat	accacca	gtgtcc	caagg	ccggtagg	1620
atgtgtc	aatag	gggg	cttg	tgac	ggagactt	1680
aggcagc	agaaga	gcagg	ttgtt	gttct	gagtc	1740
taactcc	tcgg	ttaac	aggc	agtct	gagca	1800
ctgc	cgcc	cataa	atag	gacact	actcg	1860
gtcttct	cagt	ggggat	cgg	tctag	ccat	1920
ggtctctg	accg	gttgc	cg	atgc	ccat	1980
gaaact	gggt	aat	tgat	ttt	ttt	2040
atattgt	ttat	ttat	ttat	ttt	ttt	2100
tgaatgt	tctt	ttacaa	ttt	ttt	ttt	2160
atgata	atct	ttt	ttt	ttt	ttt	2220
taacaga	ttgg	ttt	ttt	ttt	ttt	2280
tgg	tttt	ttt	ttt	ttt	ttt	2340
acaaaact	cacat	ttt	ttt	ttt	ttt	2400
ttctt	tttt	ttt	ttt	ttt	ttt	2460
ggcag	ccaa	ttt	ttt	ttt	ttt	2520
accagg	ttgg	ttt	ttt	ttt	ttt	2580
ggcgtt	gggt	ttt	ttt	ttt	ttt	2640
gtgtgt	tcac	ttt	ttt	ttt	ttt	2700
gcaagg	tctc	ttt	ttt	ttt	ttt	2760
ggcagcccc	agaacc	ttt	ttt	ttt	ttt	2820
accagg	tcgt	ttt	ttt	ttt	ttt	2880
gggag	ttgg	ttt	ttt	ttt	ttt	2940
acgg	cttc	ttt	ttt	ttt	ttt	3000
acgtt	tttc	ttt	ttt	ttt	ttt	3060
tctcc	tccgg	ttt	ttt	ttt	ttt	3120
ctgt	ttgg	ttt	ttt	ttt	ttt	3180
tggaa	agggt	ttt	ttt	ttt	ttt	3240
tgat	tttt	ttt	ttt	ttt	ttt	3300
ggaa	ggat	ttt	ttt	ttt	ttt	3360
gaacc	atgg	ttt	ttt	ttt	ttt	3420
cgggt	gtgt	ttt	ttt	ttt	ttt	3480
tttcc	ttcc	ttt	ttt	ttt	ttt	3540
atcgg	tttt	ttt	ttt	ttt	ttt	3600
ttttag	ttcc	ttt	ttt	ttt	ttt	3660
ttgat	ttcc	ttt	ttt	ttt	ttt	3720
tgac	ttcc	ttt	ttt	ttt	ttt	3780
aaaaat	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	

Fig. 5

Fig. 6

A

atgcccattgg ggtctctgca accgcgtggcc accttgtacc tgctggggat gctggcgct	60
tcctgcctcg gaaactgggt gaatgtata agtattttga aaaaaatttgaa agatcttatt	120
caatctatgc attattgtgc tacttttatat acggaaaatgt atgttcaccc cagttgaaa	180
gtaacagcaa tgaagtgc ttcttggag ttacaagtttta tttacttgc gtccggagat	240
gcaagtttcc atgatcactg agaaaatctg atcatccttag caaacaacag tttgtttct	300
aatggaaatg taacagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt	360
aaagaatttt tggacagttt tgtacatatt gtgcacatgt tcatacacac ttcggatccc	420
aaatctgctg aaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag caccgtactt cctgggggaa	480
ccgtcatgtt tccttccccc aaaaaaccc aaggacaccc tcatgtctc ccggaccctt	540
gaggtaacgtt gctgtgggtt ggacgtgagc cacaaggactt ctgaggtcaa gttcaactgg	600
tacgtggacg gctgtggaggt gcataatgccca aagacaaaagc cgccgggagga gcaagtacaac	660
agcacgtacc gtgtggtcag cgtccctcacc gtccgtcacc aggactggctt gaatggcaag	720
gagtaacagt gcaaggcttc caacaaagcc ctccccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	780
aaaggccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc ttggcccccatttcc ccggggatgag	840
ctgaccaaga accaggttcag cctgacatgc ctggtaaag gtttctatcc cagcgcacatc	900
ggcgtggagt gggagagcaaa tggcagcccg gagaacaaactt acaagaccac gcttccctgt	960
ctggactccg acggcttcctt cttctctac agaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1020
cagcagggga acgttttctc atgctccgtt atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1080
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga	1113

B

MPMGSLQPLA TLYLLGMLVA SCLGNWVNVI SDLKKIEDLI QSMHIDATLY TESDVHPSCK	60
VTAMKCFLL E LQVISLESGD ASIHDTEVNL IILANNLSS NGNVTESGCK ECEELEEKNI	120
KEFLDSFVHI VDMFINTSDP KSADKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP	180
EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNKG	240
EYKCKVSNKA LPAPIEKTI KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSITC LVKGFYPSDI	300
AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT	360
QKSLSLSPGK	370

C

MPMGSLQPLA TLYLLGMLVA SCLGNWVNVI SDLKKIEDLI QSMHIDATLY TESDVHPSCK	60
VTAMKCFLL E LQVISLESGD ASIHDTEVNL IILANNLSS NGNVTESGCK ECEELEEKNI	120
KEFLDSFVHI VDMFINTSDP RGPTIKPCPP CKCPAPNLLG GPSVFIFPPK IKDVLMSLIS	180
PIVTCVVVDV SEDDPDVQIS WFVNNVEVHT AQTQTHREDY NSTLRVVSAL PIQHQDWMSG	240
KEFKCKVNNK DLPAPIERTI SKPKGSVRAP QVYVLPPPEE EMTKKQVTLT CMVTDFMPED	300
IYVEWTNNGK TELNYKNTEP VLDSDGGSYFM YSKLRVEKKN WVERNSYSCS VVHEGLHNHH	360
TTKSFSSRTPG K	371

Fig. 7

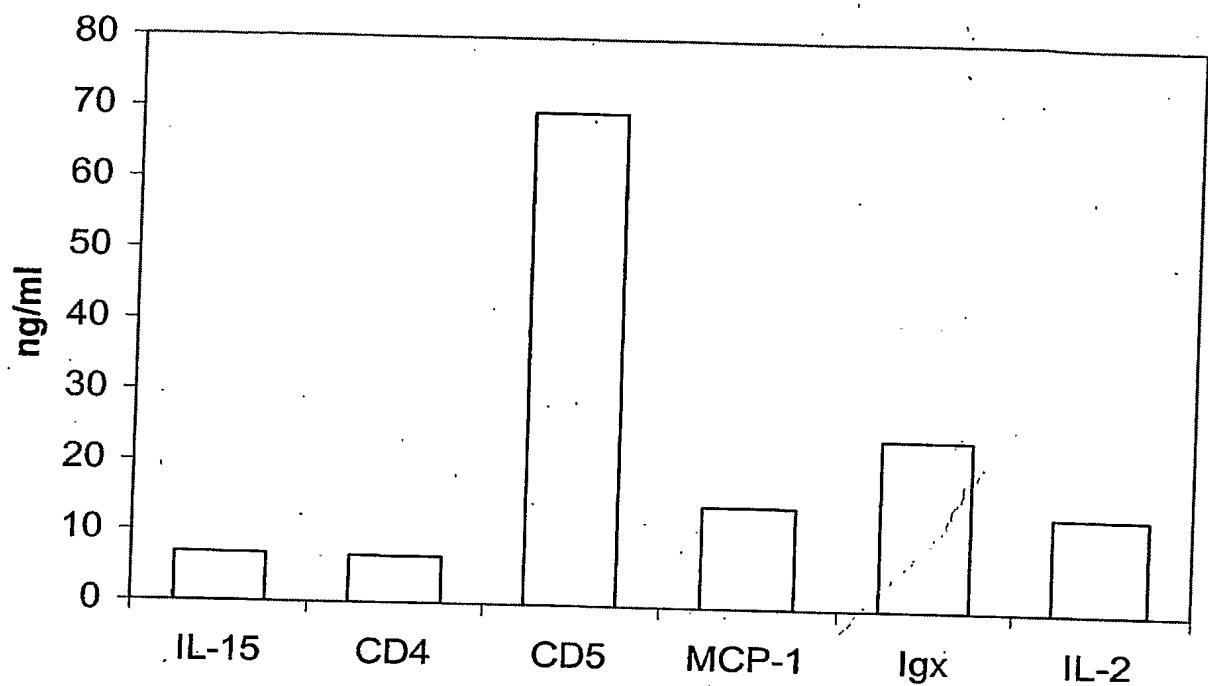


Fig. 8

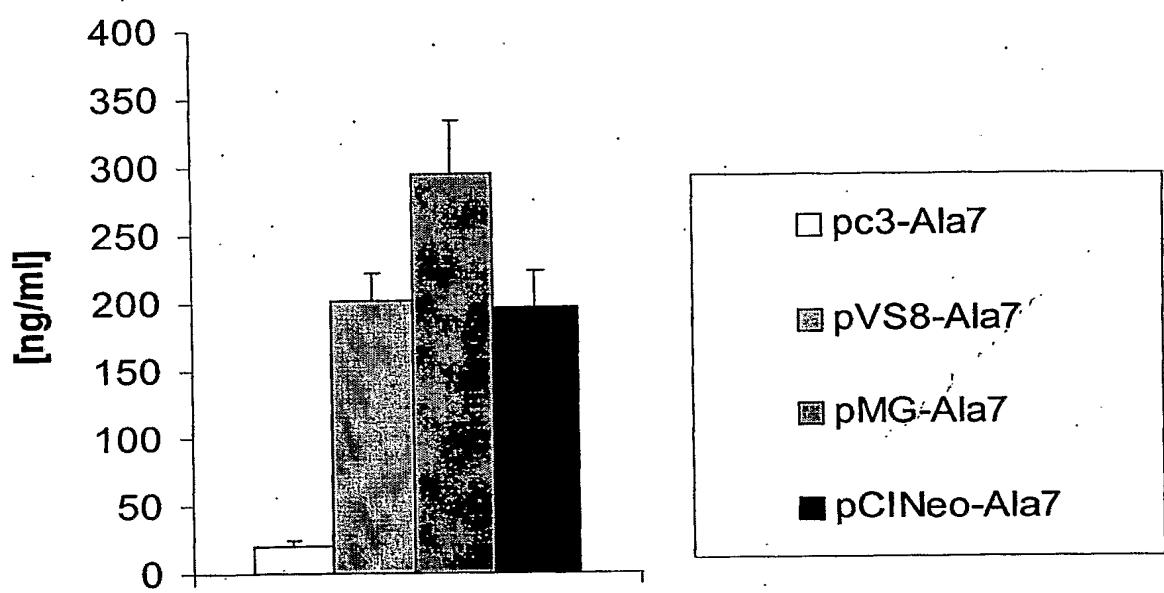
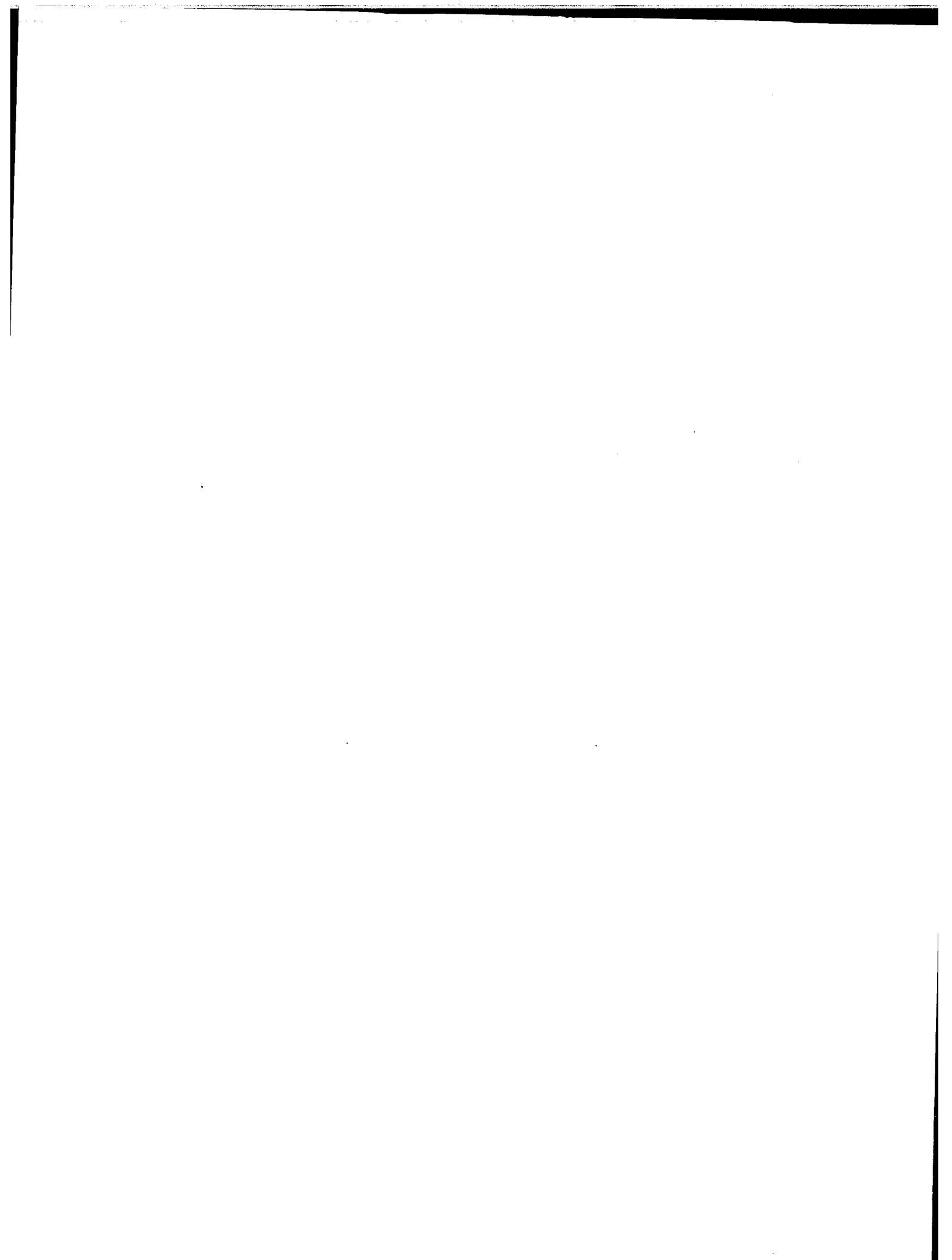


Fig. 9



C62387.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Expressionssystem zur Herstellung von IL-15/Fc-Fusionsproteinen und ihre Verwendung

<130> C62387EP

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6458

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmid pcDNA3.1hCD5.6A1a7

<400> 1		
gacggatcg gagatctccc gatccccatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg		60
ccgcatacgatt aagccaggat ctgctccctg cttgtgtgtt ggagggtcgct gagtagtgcg		120
cggcaaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatt aagaatctgc		180
ttagggtag gcgtttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt		240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggttc attagttcat agcccatata		300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggccgc tggctgaccg cccaaacgacc		360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc		420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt		480
atcatatgcc aagtacgccc cttattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt		540
atgcccagta catgaccta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca		600
tcgctattac catggtgatg cggtttggc agtacatcaa tggcgtgga tagcggtttg		660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttgc ttttggcacc		720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcgg		780
gtaggcgtgt acgggtggag gtcttatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca		840

C62387.ST25.txt

ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcaactatag	ggagacccaa	gctggctagc	900
caccatgcc	atgggtctc	tgcaaccgct	ggccacctt	tacctgctgg	ggatgctgg	960
cgcttcctgc	ctcgaaaact	gggtgaatgt	aataagtat	ttgaaaaaaaaa	ttgaagatct	1020
tattcaatct	atgcataattt	atgctacttt	atatacgaa	agtatgttc	accccagtt	1080
caaagtaaca	gcaatgaagt	gctttctttt	ggagttacaa	gttatttcac	ttgagtccgg	1140
agatgcaagt	attcatgata	cagtagaaaaa	tctgatcatc	ctagcaaaca	acagtttgc	1200
ttctaatggg	aatgtaacag	aatctggatg	caaagaatgt	gaggaactgg	aggaaaaaaaaa	1260
tattaaagaa	tttttgaca	gttttgtaca	tattgtcgac	atgttcatca	acacttcgga	1320
tcccaaatct	gctgacaaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	1380
gggaccgtca	gtcttcctct	tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgac	1440
ccctgagggtc	acgtgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	1500
ctgg tacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	1560
caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	1620
caaggagttac	aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	1680
ctccaaagcc	aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctcccc	catcccgga	1740
ttagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggc	aaaggcttct	atcccaagcga	1800
catcgccgtg	gagtggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	1860
cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	1920
gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	1980
cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaatgatct	agagggcccg	tttaaaccctg	2040
ctgatcagcc	tcgactgtgc	ttcttagttt	ccagccatct	gttgtttgcc	cctcccccgt	2100
gccttccttg	accctggaag	gtgccactcc	cactgtcctt	tcctaataaa	atgaggaaat	2160
tgcatcgcat	tgtctgagta	ggtgtcattt	tattctgggg	ggtgggggtgg	ggcaggacag	2220
caagggggag	gattggaaag	acaatagcag	gcatgctggg	gatgcgggtgg	gctctatggc	2280
ttctgaggcg	gaaagaacca	gctggggctc	taggggtat	ccccacgcgc	cctgtagcgg	2340
cgcattaagc	gcggcgggtg	tggtggttac	gcmcagcgtg	accgctacac	ttgccagcgc	2400
cctagcgccc	gctccttcg	cttcttccc	ttccttctc	gccacgttcg	ccggcttcc	2460
ccgtcaagct	ctaaatcggt	ggctccctt	agggtccga	tttagtgctt	tacggcacct	2520
cgacccaaa	aaacttgatt	agggtgatgg	ttcacgtat	gggccatcgc	cctgatagac	2580
gtttttcgc	cctttgacgt	tggagtccac	gttcttaat	agtggactct	tgttccaaac	2640
tggaaacaaca	ctcaacccta	tctcggtcta	ttctttgtat	ttataaggga	ttttgccat	2700
ttcggcctat	tggtaaaaaa	atgagctgat	ttaacaaaaa	ttaacgcga	attaattctg	2760
tggaaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaag	tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	2820
caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	2880

C62387.ST25.txt	
ggcagaagta	tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact
ccgccccatcc	cgcctttaac tccgcccagt tccgcccatt ctccgccccca tggctgacta
atttttttta	tttatgcaga ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt ccagaagtag
tgaggaggct	tttttggagg cctaggctt tgcaaaaagc tcccgggagc ttgtatatcc
attttcggat	ctgatcaaga gacaggatga ggatcgttc gcatgattga acaagatgga
ttgcacgcag	gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa
cagacaatcg	gctgctctga tgccgccgt tgccggctgt cagcgcaggg ggcggccgtt
cttttgtca	agaccgaccc gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcgg
ctatcggtgc	tggccacgac gggcgttcct tgccgcagctg tgctcgacgt tgtcactgaa
gcgggaaggg	actggctgct attggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcatctcac
cttgctcctg	ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgccgcggct gcatacgctt
gatccggcta	cctgcccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact
cgatggaaag	ccggctttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg
ccagccgaac	tgttcgccag gctcaaggcg cgcatgccc acggcgagga tctcgctcg
acccatggcg	atgcctgcctt gccaaatatc atggtgaaaa atggccgctt ttctggattc
atcgactgtg	gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcggtt ggctacccgt
gatattgctg	aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tccctcgctt ttacggattc
gccgctcccg	attcgacgcg catcgcccttc tatcgcccttc ttgacgagtt cttctgagcg
ggactctggg	gttcgaaatg accgaccaag cgacgcccaa cctgccatca cgagatttcg
attccaccgc	cgcccttat gaaagggtgg gcttcggaat cgttttccgg gacgcccggct
ggatgatcct	ccagcgcggg gatctcatgc tggagttctt cgcccaccccc aacttggata
ttgcagctta	taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat
tttttcact	gcattctagt tgtggttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct
gtataccgtc	gacctctagc tagagcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttccgtgt
gaaattgtta	tccgctcaca attccacaca acatacgacg cggaaagcata aagtgtaaag
cctgggtgc	ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgtca ctgcccgtt
tccagtcggg	aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag
gcggtttgcg	tattggcgc tcttcgcctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg
ttcggctgcg	gcgagcgtta tcagctact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat
cagggataa	cgcagggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta
aaaaggccgc	gttgctggcg ttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa
atcgacgctc	aagtcaagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgttc
ccccttggaaag	ctccctcggt cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggataccgtt
ccgccttct	cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca

c62387.ST25.txt

gttcgggtga	ggtcgttcgc	tccaaagctgg	gctgtgtgca	cgaacccccc	gttcagcccc	4980	
accgctgcgc	cttatccgg	aactatcg	tttagtccaa	cccggtaa	gacgactt	5040	
cgccactggc	agcagccact	gttaaacagg	tttagcagagc	gaggatgt	ggcggtgcta	5100	
cagagttctt	gaagtgg	cttaactac	gctacactag	aagaacag	tttggtatct	5160	
gcgcctgt	gaagccag	accttcgg	aaagagtgg	tagcttga	tccggcaa	5220	
aaaccaccgc	tggtagcg	gtttttt	tttgc	agca	gcagattac	5280	
aaggatctca	agaagatc	ttgatc	ttt	ctacgggtc	tgacgctc	tggaacgaaa	5340
actcacgtt	agggat	ttt	gtcatgag	tatcaaa	aatgatc	5400	
taaattaaaa	atgaag	ttt	ttt	aaatcaat	ct aaat	tgagtaa	5460
tttaccaat	gttaccaat	gtt	gtt	gtt	gtt	tggtctgaca	5520
tagttgcct	actcccc	gtt	gtt	gtt	gtt	ccatctggcc	5580
ccagtgct	aatgata	cc	cc	cc	cc	ccatccatcc	5640
accagccagc	cggaagg	gg	gg	gg	gg	gtggcctgc	5700
agtctattaa	ttgttgc	ccgg	ccgg	ccgg	ccgg	aaactttatcc	5760
acgttgttgc	cattgct	aca	ggc	atcgttgc	gtcgttgc	gcctccatcc	5820
tcagctccgg	ttccca	acga	tcaagg	gcg	atcgttgc	tgcaaaaa	5880
cggtagctc	ttcggt	cct	ccgat	atcg	atcg	tttgc	5940
tcatggttat	ggcag	cact	cataatt	ctc	ttactgt	gttgc	6000
ctgtgactgg	tgagt	tact	acc	agt	gttgc	atggcttcat	6060
gctcttgc	ggcgt	caata	cg	gataata	act	tttgc	6120
tcatcattgg	aaaacgtt	c	tcgggg	cgaa	tttgc	atggcttcat	6180
ccagttcgat	gtAACCC	act	gtgcac	cca	tttgc	atggcttcat	6240
gcgtttctgg	gtgag	aaaa	acag	ggc	tttgc	atggcttcat	6300
cacggaaatg	ttgaata	actc	atact	tttca	tttgc	atggcttcat	6360
gttattgtct	catgag	cg	ga	tat	tttgc	atggcttcat	6420
ttccgcgcac	at	tttcccc	ga	aaatg	ccac	tttgc	6458

<210> 2
<211> 7464
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Plasmid pMG10Ala7
<400> 2

C62387.ST25.txt	
gacggatcg gagatctccc gatcccttat ggtgcactct cagatacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgttt ggaggcgct gagtagtgcg	120
cggcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggtag gcgtttgcg ctgcttcgt a gctgcaata aacaatcatt atttcattg	240
gatctgtgt ttgggtttt gtgtggctt gggggagggg gaggccagaa tgactccaag	300
agctacagga aggcaaggta gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgcaccat	360
aacacacaat caacaggggta gtgagctgga tcgagctaga gtccgttaca taacttacgg	420
taaatggccc gcctggctga cggcccaacg accccccccc attgacgtca ataatgacgt	480
atgttccat agtaacgcca ataggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtattac	540
ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaa gtaacgtcc cccctattg	600
acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgcccgt acatgacc ttatggact	660
ttcctacttg gcagttacatc tacgtattag tcattcgctat taccatgggtg atgcgggttt	720
ggcagttacat caatggcggt ggatagcggt ttgactcactg gggatttcca agtctccacc	780
ccattgacgt caatgggagt ttgtttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc	840
gtaacaactc cgccccattg acgcaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata	900
taagcagagc tcgtttagtg aaccgtcaga tcgcctggag acgcccattca cgctgtttt	960
acctccatag aagacaccgg gaccgatcca gcctccgcgg ccgggaacgg tgcatggaa	1020
cgcggattcc ccgtgccaag agtacgtaa gtaccgccta tagactctat aggcccaccc	1080
ccttggcttc ttatgcattgc tatactgttt ttggcttggg gtctatacac ccccgcttcc	1140
tcatgttata ggtgatggta tagcttagcc tatagggtgt ggttattgac cattattgac	1200
cactccctta ttgggtacga tactttccat tactaatcca taacatggct ctttgcacca	1260
actctcttta ttggctatata gccaatacac tgccttcag agactgacac ggactctgt	1320
tttttacagg atggggtctc atttatttata tacaattca catatacaac accaccgtcc	1380
ccagtgcggc cagttttat taaacataac gtggatctc cacgcaatc tcgggtacgt	1440
gttccggaca tggctcttc tccggtagcg gcggagcttc tacatccgag ccctgctccc	1500
atgcctccag cgactcatgg tcgctcgca gctccttgct cctaacagtg gaggccagac	1560
ttaggcacag cacgatgccc accaccacca gtgtccgca caaggccgtg gcggtaggg	1620
atgtgtctga aaatgagctc gggagcggtt cttgcaccgc tgacgcattt ggaagactta	1680
aggcagcggc agaagaagat gcaggcagct gagttgtgt gttctgataa gagtcagagg	1740
taactccgt tgcgggtctg ttaacgggtgg agggcagtgt agtctgagca gtactcggt	1800
ctgcccgcgc cgccaccaga cataatagct gacagactaa cagactgttc cttccatgg	1860
gtctttctg cagtcacccg gggatcctt cgaacgtac tctagccacc atgcccattgg	1920
ggtctctgca accgctggcc accttgcatt tgctgggtt gctggcgct tcctgcctcg	1980
gaaactgggt gaatgtaata agtattttga aaaaaattga agatcttatt caatctatgc	2040

C62387.ST25.txt

atattgatgc tactttatat acggaaagtg atgttcaccc cagttgcaaa gtaacagcaa	2100
tgaagtgcct tctcttggag ttacaagtta tttcacttga gtccggagat gcaagtattc	2160
atgatacagt agaaaatctg atcatcctag caaacaacag tttgtcttct aatgggaatg	2220
taacagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt aaagaatttt	2280
tggacagttt tgtacatatt gtcgacatgt tcatcaacac ttcggatccc aaatctgctg	2340
acaaaactca cacatgccc ccgtgcccag cacctaact cctgggggga ccgtcagtct	2400
tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacgt	2460
gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg	2520
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc	2580
gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt	2640
gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag	2700
ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag ctgaccaaga	2760
accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt	2820
gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg	2880
acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga	2940
acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc	3000
tctccctgtc tccggtaaa tgatctagag ggcccgaaa aacccgctga tcagcctcga	3060
ctgtgccttc tagtgccag ccatctgtg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc	3120
tgaaagggtgc cactcccact gtccttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc	3180
tgagtaggtg tcattctatt ctgggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt	3240
ggaaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtggctc tatggcttct gaggcggaaa	3300
gaaccagctg gggctctagg ggttatcccc acgcgcctg tagcggcgc ttaagcgcgg	3360
cgggtgttgt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctta gcgcgcgtc	3420
ctttcgctt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa	3480
atcgggggct cccttaggg ttccgattta gtgcttacg gcacctcgac cccaaaaaac	3540
ttgatttaggg tgatggttca cgtagtgggc catgcgcctg atagacggtt tttcgccctt	3600
tgacgttggaa gtccacgttc ttaatagt gactcttgtt ccaaactggaa acaacactca	3660
accctatctc ggtctattct tttgatttt aaggatttt gccgatttcg gcctatttgt	3720
taaaaaatga gctgattaa caaaaattta acgcaatta attctgtgaa atgtgtgtca	3780
gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcattct	3840
caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca	3900
aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccat agtcccggcc ctaactccgc ccatccggcc	3960
cctaactccg cccagttccg cccattctcc gccccatggc tgactaattt ttttattta	4020
tgcagaggcc gaggccgcct ctgcctctga gctattccag aagtagtgag gaggctttt	4080

C62387.ST25.txt

tggaggccta ggctttgca aaaagctccc	4140
ggagactgt atatccattt tcggatctga	
tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgc	4200
cat gattgaacaa gatggattgc acgcagg	
ttcggccgct tgggtggaga ggctattcg	4260
ctatgactgg gcacaacaga caatcg	
ctctgatgcc gccgttcc ggctgtc	4320
gcaggggcgc ccggttctt ttgtcaagac	
cgacctgtcc ggtgc	4380
ccctga atgaactgca ggacgaggca	
gcgcggctat cgtggcttgc	
cacgacggc gttccttgc	4440
cagctgtc	
cgacgttgc actgaagcgg	
gaaggactg gctgctattt	4500
ggcgaagtgc cggggcagga	
tctcctgtca tctcac	
cttgc	4560
cccttgcac caccaagcga	4620
aacatcgcat cgagcgagca	
cgtactcgga tggaagccgg	
tcttgcgat caggatgatc	4680
tggacgaaga gcatcagg	
ctcgcc	
ccgaactgtt cgccaggctc	4740
aaggcgcga tgccgacgg	
cgaggatctc gtcgtgaccc	
atggcgatgc ctgcttgcg	4800
aatatcatgg tggaaaatgg	
ccgctttct ggattcatcg	
actgtggccg gctgggtgt	4860
gcggaccgt atcaggacat	
agcgttgc acccggtata	
ttgctgaaga gcttggcgc	4920
gaatggctg acccgctt	
cgtcttac ggtatcgcc	
ctcccgattc gcagcgc	4980
catc gccttctatc	
gccttctga cgagttctc	
tgagcgggac tctgggttgc	
gaaatgaccg accaagcga	5040
gcccaacctg ccatc	
acgag atttcgattt caccggcc	
ttctatgaaa gtttggcctt	5100
cggaatcg	
ttccggacg cggctggat	
gatcctccag cgccgggatc	5160
tcatgcttga gtttgc	
cacccaact ttttatgc	
agcttataat gtttacaaat	5220
aaagcaatag catcacaaat	
ttcacaaata aagcattttt	
ttcactgc	
tcttagtgc gtttgc	5280
ccaa actcatcaat	
gtatcttac atgtctgtat	
accgtcgacc tctagctaga	5340
gcttggcgt	
atcatggta tagctttc	
ctgtgtaaa ttgttatccg	
ctcacaattt cacacaacat	5400
acgagccga agcataaagt	
gtaaagcctg gggcctaa	
tgagtgc	5460
aactcacatt aattgcgtt	
cgctca	
ccgcttcca gtcggaaac	
ctgtcg	5520
ccgtcatta atgaatcg	
caacgcgcgg ggagaggcgg	
tttgcgtatt gggcgtt	5580
ccgcttcc	
gctca	
tcgctgcgt	
cggtatc	5640
ctcactcaa ggcgtata	
cggtatcca cagaatcagg	
ggataacgca gaaaaaaca	5700
tgtgagcaaa aggccagca	
aaggccagga accgtaaaaa	
ggccgcgtt	
ctggcg	5760
ttttccataggct	
ccgc	
cccttgcgt	
gacgacatc aaaaaatcg	
acgctca	
actgtgc	5820
gaaacccgac aggactataa	
agataccagg cgttcccc	
ttggagctcc	5880
ctcctgttcc	
gaccctgc	
cttaccggat	
acctgtccgc	
ctttctcc	
tcggaaagcg tggcg	5940
cttcc	
tcata	
cgctgttaggt	
atctcagttc	
ggtgttaggt	
gttcgcttcca	6000
agctggcgt	
tgtgcacgaa	
ccccccgtt	
agccc	
gaccg	
ctgcgc	
cctta	
tccggtaact atcgtt	6060
cttga	
gtccaacccg	
gtaagacacg	
acttatcg	
ccactggc	
gca	6120

C62387.ST25.txt

tggtggccta	actacggcta	cactagaaga	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	6180
ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctgg	6240
agcggtggtt	ttttgtttg	caagcagcag	attacgcgc	aaaaaaaaagg	atctcaagaa	6300
gatccttga	tctttctac	ggggctgac	gctcagtgg	acgaaaactc	acgtaaggg	6360
attttggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tcctttaaa	ttaaaaatga	6420
agttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttgg	ctgacagtta	ccaatgctta	6480
atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcgtt	catccatagt	tgcctgactc	6540
cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	6600
ataccgcgag	acccacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	6660
agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	6720
tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	6780
gctacaggca	tcgtgggtgc	acgctcg	tttggtatgg	cttcattcag	ctccgggtcc	6840
caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atgttgtgca	aaaaagcggt	tagtccttc	6900
ggtcctccga	tcgttgtcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	6960
gcactgcata	attctcttac	tgtcatgcca	tccgtaagat	gctttctgt	gactggtgag	7020
tactcaacca	agtcattctg	agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgccccggcg	7080
tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaactttaa	aagtgctcat	cattggaaaa	7140
cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	7200
cccactcg	cacccaactg	atcttcagca	tctttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	7260
gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aaggaataa	gggcgacacg	gaaatgttga	7320
atactcatac	tcttccttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	ttgtctcatg	7380
agcggataca	tatgtaatg	tattttagaaa	aataaacaaa	taggggttcc	gccccacattt	7440
ccccgaaaag	tgccacctga	cgtc				7464

<210> 3

<211> 1113

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> DNA für mutiertes IL-15/Fc mit CD5-Leader

<400> 3	atgccccatgg	ggtctctgca	accgctggcc	accttgtacc	tgctggggat	gctggtcgt	60
	tcctgcctcg	gaaactgggt	aatgtataa	agtgattga	aaaaaattga	agatcttatt	120
	caatctatgc	atattgatgc	tactttat	acggaaagt	atgttcaccc	cagttgcaaa	180

C62387.ST25.txt

gtaacagcaa	tgaagtgc	tttctggag	ttacaaggta	tttcacttga	gtccggagat	240
gcaagtattc	atgatacagt	agaaaatctg	atcatcctag	caaacaacag	tttgtcttct	300
aatggaaatg	taacagaatc	tggatgcaaa	aatgtgagg	aactggagga	aaaaaatatt	360
aaagaatttt	tggacagttt	tgtacatatt	gtcgacatgt	tcatcaacac	ttcggatccc	420
aatctgctg	acaaaactca	cacatgccca	ccgtgcccag	cacctaact	cctgggggga	480
ccgtcagtct	tcctcttccc	ccccaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccct	540
gaggtcacgt	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	600
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacaac	660
agcacgtacc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	aatggcaag	720
gagtacaagt	gcaaggcttc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	780
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgccccatc	ccggatgag	840
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	900
gccgtggagt	gggagagc	aaa tggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	960
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1020
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgt	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactaacacg	1080
cagaagagcc	tctccctgtc	tccggtaaa	tga			1113

<210> 4

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Aminosäuresequenz des humanen CRB-15 mit Leader CD5

<400> 4

Met	Pro	Met	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu	Leu	Gly
1						5				10				15	

Met	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Gly	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp
							20			25			30		

Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr
							35			40			45		

Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val	His	Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met
						50				55			60		

Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp
						65			70			75			80

C62387.ST25.txt

Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn
85 90 95

Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
100 105 110

Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Asp Ser Phe Val
115 120 125

His Ile Val Asp Met Phe Ile Asn Thr Ser Asp Pro Lys Ser Ala Asp
130 135 140

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
165 170 175

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
180 185 190

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
195 200 205

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
210 215 220

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
225 230 235 240

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
245 250 255

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
260 265 270

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
275 280 285

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
290 295 300

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
325 330 335

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
340 345 350

C62387.ST25.txt

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
355 360 365

Gly Lys
370

<210> 5

<211> 371

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Aminosäuresequenz des murinen IL-15/Fc (humanes mutiertes IL-15,
muriner IgG2A) mit CD5-Leader

<400> 5

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp
20 25 30

Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr
35 40 45

Ile Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
50 55 60

Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp
65 70 75 80

Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn
85 90 95

Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
100 105 110

Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Asp Ser Phe Val
115 120 125

His Ile Val Asp Met Phe Ile Asn Thr Ser Asp Pro Arg Gly Pro Thr
130 135 140

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
145 150 155 160

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
165 170 175

C62387.ST25.txt

Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
180 185 190

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
195 200 205

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
210 215 220

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
225 230 235 240

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
245 250 255

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
260 265 270

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
275 280 285

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
290 295 300

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
305 310 315 320

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
325 330 335

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
340 345 350

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
355 360 365

Pro Gly Lys
370